

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE AKTIVNÍCH LÁTEK V RŮZNÝCH DRUZÍCH PIVA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PAVLA BENEŠOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE AKTIVNÍCH LÁTEK V RŮZNÝCH DRUZÍCH PIVA

CHARACTERIZATION OF ACTIVE SUBSTANCES IN SEVERAL KINDS OF BEER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PAVLA BENEŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0384/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Pavla Benešová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Kateřina Pařilová	

Název bakalářské práce:

Charakterizace aktivních látek v různých druzích piva

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše:
 - a) přehled druhů piva, rozdíly technologického zpracování, specifika nealkoholického piva
 - b) přehled možností stanovení aktivních látek fenolické povahy v pivu.
2. Optimalizace analýzy polyfenolických látek v pivu metodou HPLC/UV-VIS a HPLC/PDA .
3. Analýza fenolických a dalších charakteristických aktivních látek v různých druzích nealkoholického piva, srovnání s alkoholickými pivy.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse.

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Pavla Benešová
Student(ka)

doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá analýzou biologicky aktivních látek, především fenolické povahy v 10 druzích nealkoholických piv a následném porovnání s pivem alkoholickým. V teoretické části je uvedena výroba piva, která je rozšířena o výrobu piva nealkoholického. Dále jsou zde rozebrány látky charakterizující české pivo – tj. proteiny, polyfenoly, hořké látky. K analýze proteinů byl použit mikrofluidní elektroforetický systém Experion. Analýza polyfenolů, flavonoidů, pivovarských charakteristik a antioxidační aktivita byla měřena spektrofotometricky. U vybraných značek piv byly fenolické látky identifikovány a kvantifikovány pomocí LC/ESI-MS analýzy. Porovnáním získaných výsledků byl zjištěn obsah biologicky aktivních látek srovnatelný s pivy alkoholickými a to především co se týče obsahu látek fenolické povahy.

SUMMARY

The aim of this bachelor thesis is to analyse biologically active compounds, especially of phenolic character, in 10 kinds of alcohol-free beer in comparison with alcoholic beer. In theoretical part basic steps of brewery technology are described including alcohol-free beer production. Characteristic compounds occurring especially in Czech beer e.g. proteins, phenolics, bitter substances and also methods for their analysis are discussed as well.

Microfluidic electrophoresis (Experion, BioRad) was used to beer protein analysis. Phenolic compounds, flavonoids, technological characteristics and antioxidative activity were measured by spectrophotometry. Individual phenolics of selected beers were identified and quantified by LC/ESI-MS analysis too. In alcohol-free beers similar concentrations of biologically active compounds were found in comparison with alcoholic beers, especially in the case of beer phenolics.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nealkoholické pivo, české pivo, biologicky aktivní látky, polyfenoly

KEY WORDS

Alcohol-free beer, Czech beer, biologically active compounds, phenolic

BENEŠOVÁ, P. *Charakterizace aktivních látek v různých druzích piva*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 60 s. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Mé poděkování patří především vedoucí mé bakalářské práce Doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za, odborný dohled a rady v průběhu práce. Dále pak také velice děkuji Ing. Kateřině Pařilové za pomoc s prací v laboratoři, cenné rady, ochotu a věnovaný čas.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Historie piva v Čechách	8
2.1.1	Historie alkoholického piva	8
2.1.2	Historie piva nealkoholického	10
2.2	Technologie výroby piva	10
2.2.1	Suroviny	10
2.2.2	Sladovna.....	14
2.2.3	Výroba mladiny	18
2.2.4	Výroba piva	20
2.3	Výroba piva nealkoholického	22
2.3.1	Základní způsoby výroby nealkoholického piva	22
2.3.2	Evaporační membránové techniky	22
2.3.3	Limitovaná fermentace	23
2.3.4	Mutantní kvasinky.....	23
2.4	Biologicky aktivní látky v pivu	23
2.4.1	Antioxidanty.....	23
2.4.2	Hořké chmelové látky	25
2.4.3	Proteiny.....	26
2.4.4	Sacharidy.....	26
2.4.5	Vitamíny, provitamíny, minerální a stopové prvky	26
3	CÍL PRÁCE	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1	Použité chemikálie, přístroje a pomůcky	28
4.1.1	Standardní chemikálie.....	28
4.1.2	Chemikálie pro elektroforézu	28
4.1.3	Ostatní chemikálie	28
4.1.4	Přístroje, pomůcky	28
4.2	Analyzované vzorky piva	29
4.2.1	Zpracování vzorků pro analýzy.....	29
4.2.2	Stanovení antioxidačních látek	29
4.2.3	Stanovení pivovarských parametrů a charakteristik	30
4.2.4	Mikročipová elektroforéza	31
4.2.5	Stanovení vitamínu C	33
4.2.6	Stanovení polyfenolických látek pomocí LC/PDA/ESI-MS analýzy	33
4.2.7	Kalibrace a optimalizace (ladění) hmotnostního spektrometru	34

5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	36
5.1	Stanovení aktivních látek v nealkoholickém pivu	36
5.1.1	Celkové polyfenoly	36
5.1.2	Celkové flavonoidy	36
5.1.3	Antioxidační aktivita.....	37
5.1.4	Hořké látky	38
5.1.5	Skutečný a zdánlivý extrakt.....	40
5.2	Stanovení proteinů mikročipovou elektroforézou.....	41
5.3	Stanovení vitamínu C	43
5.4	Chromatografické separace flavonoidních sloučenin piva	43
5.4.1	Optimalizace poměru rozpouštědel v mobilní fázi	43
5.4.2	Optimalizace izolace polyfenolických látek z piva.....	44
5.5	Optimalizace parametrů MS detekce	44
5.5.1	Kvantifikace fenolických látek	45
6	ZÁVĚRY	50
7	LITERATURA.....	52
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	55
9	SEZNAM PŘÍLOH.....	55
10	PŘÍLOHY.....	56

1 ÚVOD

Sladařství a pivovarnictví má svůj dávný původ již ve starém středověku. Jako vůbec první začali pivo vařit Babyloňané 7. tisíc let před naším letopočtem. První písemná zmínka o vaření piva, byla nalezená u Sumerů z období 6. - 4. tisíc let před naším letopočtem. Historicky je také doloženo, že vaření piva bylo známé v Číně, Egyptě, Řecku a v neposlední řadě také mezi Slovy, Židy a Germány [1].

České pivo si zachovává i v době globalizace, kdy většina největších tuzemských pivovarů patří zahraničním vlastníkům, charakteristické vlastnosti, které jej odlišují od zahraničních piv. Rozdílné vlastnosti českého piva jsou dány nejen použitými surovinami, zvláštěními odrůdami chmele a ječmene, ale také metodou dvoustupňového spodního kvašení. Na tom, že si česká piva zachovala svá specifika, má mimo jiné podíl i dlouho trvající období komunismu. V zemích zejména západních docházelo k modernizacím pivovarů. České pivovary se dočkaly změn a modernizací až po roce 1989. Jak se časem ukázalo, toto zpoždění mělo pro pivovary v naší zemi jistou výhodu, mohlo být využito nových vědeckých poznatků, které napomohly při aplikacích moderních technologií a zároveň umožnily plně zachovat charakter českého piva.

V říjnu roku 2008 bylo schváleno Evropskou komisí užití chráněného zeměpisného označení „České pivo“. Toto označení má napomáhat transportu českého piva do zahraničí a zamezit jeho napodobování. Uchazeč o toto označení musí být schopen splnit určité požadavky. Místo výroby piva se musí nacházet na území České republiky, výrobce je povinen uvést předepsaný původ a složení základních surovin. Hotové pivo pak musí plnit kvalitativní ukazatele, jako jsou extrakt v přírodní mladině, obsah alkoholu, barva, hořkost, pH a míra prokvašení [2, 3].

název	datum
Černá hora	6.11.2009
Brněnské pivo; Starobrněnské pivo	24.7.2009
Znojemské pivo	6.5.2009
Březnický ležák	probíhá
České pivo	17.10.2008
Chodské pivo	31.5.2008
Budějovické pivo	23.9.2003
Budějovický měšťanský var	23.9.2003
Českobudějovické pivo	23.9.2003

Tabulka 1: Přehled pivovarů vlastníků známku „české pivo“ [4]



Obrázek 1: Ochranná známka [5]

Co dělá české pivo tak specifickým? Především jsou to jeho senzorické vlastnosti. České pivo je pivo s vyhraněným charakterem. Lze jej charakterizovat jako pivo světlé s chmelovou vůní, silným řízem a plností, a se silnou intenzitou hořkosti poněkud drsnějšího charakteru. Dalšími charakteristickými rysy je zlatavá barva, jiskrná čírost a bohatá a kompaktní pěna. Celková vůně českého piva by měla být kompaktní tak, aby žádná vůně nevynikala. Říz je způsoben uvolňováním bublinek kvasného oxidu uhličitého, což vyvolává v ústech štiplavý pocit s osvěžujícím účinkem a v trávicím traktu vykazuje příznivé digestivní účinky.

V hořkosti piva musí být v rovnováze její intenzita a charakter. Pivo chmelené českým chmelem by mělo vyvolávat touhu po dalším napití [6].

Cílem předložené práce je analýza aktivních látek ve vybraných druzích nealkoholického piva ve srovnání s pivy alkoholickými. Nealkoholická piva jsou stále oblíbenější a jejich spotřeba roste, takže i pivovary zaměřené na produkci českého piva vyrábějí nealkoholické alternativy. Informace o složení a potenciálních pozitivních zdravotních účincích nealkoholických piv lze tedy považovat za aktuální z hlediska výrobců i spotřebitelů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie piva v Čechách

2.1.1 Historie alkoholického piva [7, 8]

2.1.1.1 Plzeň

Město Plzeň bylo založeno roku 1295; klenotem mezi právy, která městům udílel král, bylo právo tzv. vářečné. Nejstarší známka o plzeňském pivovaru se sladovnou je z roku 1307. V roce 1839 se pivovarníci dohodli, že se za účelem zlepšení kvality plzeňského piva spojí a postaví si velký společný Měšťanský pivovar.

Sládek Josef Grill začal vařit spodně kvašené pivo. První várka byla uvařena 5. října 1842. Vznikl tak počátek světoznámého světlého ležáku plzeňského typu. Jeho označení „Pilsner Bier“ zapsané v roce 1859 jako ochranná známka. Tu si však Plzeň neudržela, stalo se z ní označení druhu piva. Úspěch plzeňského pivovaru inspiroval k výstavbě dalších pivovarů.

2.1.1.2 České Budějovice

V roce 1265 bylo město založeno Přemyslem Otakarem II, toto datum je také datem, kdy se v Českých Budějovicích začalo vařit pivo. V roce 1464 došlo na uplatnění práva mílového a ve velkém okruhu kolem města se nesmělo vařit pivo, bylo zničeno vše, co připomínalo sladovnické a pivovarské zařízení. Následují spory a dohady kolem pivovarů, které trvaly ve větší či menší míře až do roku 1895. V tomto roce začal na Pražském předměstí Českých Budějovic vařit pivo Český akciový pivovar – dnešní Budvar. V roce 1922 byla vyvrtána první 300 m hluboká artéská studně. Během evropského historického vývoje, zejména vlivem druhé světové války docházelo mezi těmito dvěma pivovary k střídání prvenství a nadvlády [8, 9].

2.1.1.3 Nošovice

V této malé vesničce na úpatí Beskyd nedaleko Frýdku Místku se vaří známý Radegast. Pivovar je druhým největším producentem piva u nás, ale zároveň také jedním z nejmladších. První várka piva zde byla uvařena v roce 1970. Nošovický pivovar byl moderním socialistickým pivovarem. Nejprve se pivo jmenovalo Beskydská desítka, později dostal jméno Radegast, podle pohanského boha Radegasta spjatého s Beskydami. Pivovar již od samého počátku vařil velmi dobré pivo a také docházelo k modernizacím. V roce 1991 se stal samostatnou akciovou společností. V rámci globalizace došlo v roce 1999 ke koupi nošovického pivovaru společností SAB, která v té době vlastnila plzeňský Prazdroj. Dnes nošovický pivovar vyniká především produkcí nealkoholického piva známého pod značkou Birrell.

2.1.1.4 Brno

Královna Eliška Rejčka, žijící na Špiberku, byla ta, která zapříčinila vznik pivovaru v Brně. Rozhodla se pro vystavění klášteru a sním i klášterního pivovaru. Stavba pivovaru začala v roce 1325, o dva roky později než stavba klášteru. V roce 1872 byl pivovar přestavěn a modernizován, proto se často uvádí právě toto datum jako rok vzniku pivovaru. V roce 1933 byl brněnský pivovar největším pivovarem na Moravě. Roku 1944 došlo k poškození pivovaru náletem, a v roce 1945 k znárodnění. Od roku 2003 patří Starobrna mezinárodnímu koncernu Heineken. Vaří se zde přes deset druhů piv, včetně pivních speciálů, mezi nejznámější patří Červený Drak.

2.1.1.5 Praha

V roce 1869 byl na pražském Smíchově založen pivovar Staropramen. Značku Staropramen si zaregistroval až v roce 1911. Dnes je čtvrtým největším pivovarem u nás. Vyrábí se zde, světlý ležák, tmavý ležák a polotmavý ležák – Staropramen Granát. Smíchovský pivovar je také významným producentem nealkoholického piva.

2.1.1.6 Litovel

V Litovli se jako ve všech středověkých městech vařilo pivo v tzv. právovárečných domech. Společný pivovar si právováreční postavili až v roce 1170, v roce 1814 byl pivovar přestaven a modernizován.

2.1.1.7 Černá Hora

Pivovar v Černé hoře je typickým představitelem panského pivovaru. Jeho založení se datuje k roku 1530. V roce 1802 pivovar vyhořel a poté znovu v roce 1868. Rolnická akciová společnost pivovarnictví a sladovnictví v Černé Hoře byla založena roku 1896. V roce 1923 byl této společnosti prodán pivovar v Černé Hoře, která ho spravovala až do roku 1948, kdy byl pivovar znárodněn. Až v roce 1996 se pivovar úplně osamostatnil a stal se akciovou společností Pivovar Černá Hora.

2.1.1.8 Svijany

Roku 1820 přicházejí Rohanové, Svijany jsou připojeny k Sychrovu a jsou i nadále hospodářským dvorem a pivovar je jeho součástí. Pivovar jim patřil do roku 1912, kdy jej koupil jeho dosavadní nájemce a sládek Antonín Kratochvíle. Rodinná dynastie Kratochvílů působila ve svijanském pivovaru až do roku 1939. Vnuk původního majitele, rovněž Antonín, byl nucen pivovar prodat. Pivovar se opět vrátil Rohanům. Po roce 1945 byl pivovar konfiskován a posléze znárodněn, stal se provozem Severočeských pivovarů n. p. Se změnami v politické i hospodářské oblasti končí společnost Severočeské pivovary n.p. a v roce 1990 vzniká státní podnik Pivovary Vratislavice nad Nisou, jehož součástí je i pivovar Svijany. V roce 1992 se státní podnik mění na akciovou společnost a v roce 1997 se stává součástí a.s. Pražské pivovary, jejichž majoritním vlastníkem je anglická pivovarská společnost Baas. V roce 1998 vzniká společnost Pivovar Svijany s. r. o.

2.1.1.9 Velké Březno

Pár kilometrů od Ústí nad Labem, ve směru toku řeky Labe se nachází pivovar Velké Březno. Původní značka piva byla Aussiger Bier, ale po znárodnění pivovarů po 2. světové válce a vytvoření národního a později koncernového podniku Severočeské pivovary se od roku 1967 používá značka Zlatopramen. Původ tohoto názvu pochází z označení výběrového

mosteckého ležáku Goldquell, který byl vyhlášeným výrobkem měšťanského pivovaru v Mostě, který se tak jako pivovar v Ústí nad Labem stal součástí národního podniku Severočeské pivovary.

2.1.1.10 Humpolec

Humpolecký pivovar byl založen již v 16. století. V roce 1991 se Stanislav Bernard, Josef Vávra a Rudolf Šmejkal pustili do oživení humpoleckého pivovaru. Takto obnovený pivovar nese název Bernard. Od roku 2000 působí jako akciová společnost a v červenci 2001 navýšili základní jmění vstupem strategického partnera Duvel Moortgat z Belgického království. Pivovar Bernard je výjimečný především výrobou nepasterizovaného piva a také širokou škálou piv nealkoholických [8].

2.1.2 Historie piva nealkoholického

Historie nealkoholického piva se začala psát krátce po druhé světové válce, kdy se švýcarští a němečtí sládci začali zabývat možností odstranění alkoholu z klasického piva a umožnit tak konzumaci tohoto moku těm, kteří z nějakého důvodu alkohol konzumovat nechtějí, nebo nemohou.

Výroba nealkoholického piva se k nám dostala až o 30 let později, a to hlavně díky zvýšení motorismu během sedmdesátých let v tehdejší Československu. První nealkoholické pivo bylo vyrobeno v Českých Budějovicích v roce 1975 pod názvem PITO. Tento název vznikl složením dvou slov, a sice Pivo a auto [10, 11].

2.2 Technologie výroby piva

Výrobu piva, jako takovou lze rozdělit na dvě části, část sladovnickou a část, kdy dochází k výrobě samotného piva [13].

2.2.1 Suroviny

Při výrobě piva je důležité volit vhodné a kvalitní výchozí suroviny. Každá surovina vnáší do piva charakteristické vůně, chutě a má nesporný vliv na konečné organoleptické vlastnosti.

2.2.1.1 Ječmen

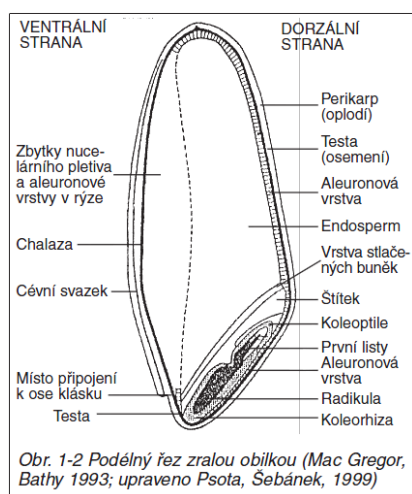
(*Hordeum vulgare* L.)

Ječmenářství bylo významnou součástí českého zemědělství již v dobách Rakouska - Uherska a jeho úroveň se udržela i po roce 1918 v novém československém státě. V současné době jsou na našich polích pěstovány především odrůdy zahraniční. Tato skutečnost je ovlivněna určitým úpadkem českého šlechtění ječmene a zároveň silným vlivem globalizace [12].

Sladovnická jakost ječmene je hodnocena dle daných parametrů. K hodnoceným parametrům patří obsah dusíkatých látek v zrna ječmene, extrakt v sušině sladu, relativní extrakt při 45 °C. Kolbachovo číslo, diastatická mohutnost, dosažitelný stupeň prokvašení, friabilita saldu a obsah β -glukanů ve sladince. Současnými světovými a evropskými požadavky na kvalitu sladovnického ječmene jsou preferovány odrůdy se silnou enzymatickou aktivitou, vysokým obsahem extraktu a vysokými hodnotami dosažitelného stupně prokvašení. Tento trend vedl také k ovlivnění senzorického charakteru evropských piv.

Norma ČSN 46 1100-5 Ječmen sladovnický je předmětovou normou, ve které jsou stanoveny požadavky našeho zpracovatelského průmyslu, tj. sladoven a pivovarů, na kvalitu

zrna sladovnického ječmene. Hodnocení kvality zrna, sladu a následně piva má vliv na stanovení ceny [14].



Obrázek 2: Zrno ječmene [13]

Sacharidy	
škrob	60-65
(amylosa 17-24 % škrobu)	
(amylopektin 76-83 % škrobu)	
Nízkomolekulární sacharidy	
sacharosa	1-2
ostatní cukry	1
rafinosa	0,3-0,5
maltosa	0,1
glukosa	0,1
fruktosa	0,1
Neškrobné polysacharidy	
hemicelulosa:	
β-glukany	3,3-4,9
pentosany	9
celulosa	4-7
Tuky	3,5
Fosfáty	
fytin	0,9
Polyfenoly	0,1-0,6
Dusíkaté látky	7-18
rozpuštěné dusíkaté látky	1,9
albuminy a globuliny	3,5
hordeiny (prolaminy)	3-4
gluteliny	3-4
Minerální látky	2

Tabulka 2: Chemické složení obilky ječmene (%) [12]

2.2.1.2 Chmel

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) vznikl staletým přirozeným i umělým výběrem z chmele planého. Chmel je vytrvalá popínavá rostlina. Chmel jako jedna ze základních surovin pro výrobu piva významným způsobem spoluvytváří jeho senzorické vlastnosti [12].

Podle barvy spodní části révy a hlávek na začátku vývoje dělíme chmele na červeňáky a zeleňáky. Červeňáky se na rozdíl od zeleňáků vyznačují obsahem barviva antokyanu [15].

V České republice bylo v roce 2007 registrováno 7 druhů chmele – Žatecký poloraný červeňák (9 klonů), Sládek, Harmonie, Bor, Premiant, Rubín a Agnus. Obsah α -hořkých kyselin je považován za nejdůležitější kvalitativní znak chmele. V komerčních odrůdách se pohybuje v rozmezí 2,5 až 17 % hm. Na základě obsahu těchto kyselin se chmele rozdělují do čtyř komerčně i technologicky odlišných skupin:

- Jemné aromatické** – tyto chmele jsou vhodné pro přímé chmelení, do této skupiny řadíme především Žatecký poloraný červeňák. Obsah α -hořkých kyselin se zde pohybuje v rozmezí 2,5 – 4,0 %.
- Aromatické** – obsah α -hořkých kyselin je zde 4 – 7 %, do této skupiny patří chmele Sládek a Harmonie.
- Hořké** – obsah α -kyselin se pohybuje v rozmezí 7 – 10 %, z českých odrůd zde patří Bor, Premiant a Rubín.
- Vysokoobsažné** - α -kyseliny jsou zde zastoupené 12 – 17 %, odrůda se odlišuje výraznou ostrou vůní a odlišným aroma. Tato odrůda je používána především k výrobě chmelových extraktů, z českých chmelů je to odrůda Agnus [12].

V České republice jsou povoleny tři oblasti pěstování chmele: Žatecko, Ústěcko a Tršicko.

Složka	ŽPČ	Sládek	Harmonie	Bor	Premiant	Agnus
celkové pryskyřice (% hm.)	13-20	17-24	22-26	18-25	19-25	26-32
α -hořké kyseliny (% hm.)	3,0-6,0	4,8-8,0	4,0-8,0	6,5-11,0	7,0-11,0	11,0-15,0
β -hořké kyseliny (% hm.)	4,5-8,0	3,5-8,0	4,0-8,0	3,5-6,0	3,5-6,0	5,0-8,0
poměr α/β	0,60-0,90	0,70-1,30	0,80-1,20	1,60-2,30	1,70-2,30	1,90-2,60
kohumulon (% rel.)	23-26	25-31	19-22	22-27	18-23	29-38
kolupulon (% rel.)	39-43	45-51	36-40	43-48	39-44	51-59
Chmelové polyfenoly						
celkové polyfenoly (% hm.)	4,5-6,0	3,0-4,0	2,7-3,5	3,0-4,0	3,0-4,0	2,5-3,5
xanthohumol (% hm.)	0,30-0,50	0,50-0,75	0,40-0,70	0,40-0,60	0,30-0,50	0,80-1,10
Chmelové silice						
Hmotnost (g/100 g)	0,4-1,0	1,0-2,0	1,0-2,0	1,0-2,0	1,0-2,0	2,0-3,0
myrcen (% rel.)	25-40	40-50	30-40	40-55	35-45	40-55
linalool (% rel.)	0,4-0,8	0,2-0,4	0,9-1,4	0,2-0,4	0,4-1,0	0,4-0,8
2-undekanon (% rel.)	0,3-0,8	1,0-2,0	1,0-2,0	0,5-1,5	0,7-1,5	1,2-1,6
methyl-4-deceonát (% rel.)	0,9-1,5	1,0-2,0	1,0-1,8	0,9-1,7	1,0-1,7	1,6-2,1
β -karyofylen (% rel.)	6-9	8-13	6-11	7-12	7-13	9-13
α -humulen (% rel.)	15-25	10-20	20-31	25-35	25-35	15-22
β -farnesen (% rel.)	14-20	pod 1	pod 2	pod 1	1-3	pod 0,2
selineny (% rel.)	0,5-1,5	0,5-1,5	10-19	pod 1,0	0,5-1,5	1,5-3,0

Tabulka 3: Obsah a složení chmelových pryskyřic, silic a polyfenolů českých odrůd chmele [12]

2.2.1.3 Voda

Na výrobu kvalitního a sensoricky uspokojivého piva je nutné zajistit takovou vodu, aby neohrozila konečnou chuť výrobku. Jako varní vodu lze používat vodu spodní, nebo povrchovou. Oba dva zdroje se značně odlišují ve svém složení. Spodní vody mají nízký obsah organických látek a přítomných mikroorganismů a vysoký obsah iontů. Povrchové vody jsou často zakalené s obsahem rozpuštěných a koloidních látek organického a anorganického charakteru. V této vodě je také zvýšená přítomnost mikroorganismů a řas.

Tuhé částice z varných vod jsou odstraňovány na česlích, případně sítích. Po tomto procesu následuje koagulace koloidních látek pomocí solí Fe^{2+} a Al^{3+} . Vzniklý kalový mrak je poté odstraněn pomocí sedimentace. Částice, které nebylo možno odstranit sedimentací, musí být zfiltrvány. Tato filtrace bývá aplikována přes vrstvu zrnitého materiálu, nejčastěji písku.

Aby došlo k zajištění mikrobiologické nezávadnosti vody, využívá se chlorování, aplikace oxidu chloričitého, ozonování a působení UV paprsků. První dvě chemické cesty, nejsou v pivovarnictví vhodným řešením. Mohlo by dojít k poškození chuti piva a pro konzumenty by se tak stal výrobek neatraktivním [13].

Jaké parametry by měla varní voda mít, je prezentováno obrázku č. 3.

Tab. 12-7 Charakteristika význačných pivovarských vod				
	plzeňská	mnichovská	dortmundská	vídeňská
Celková tvrdost [mmol.l ⁻¹]	1,0	2,7	7,4	6,9
Karbonátová tvrdost [mmol.l ⁻¹]	0,6	2,5	2,3	5,6
Dusičnany [mg.l ⁻¹]	18,0	stopy	stopy	stopy
Síraný [mg.l ⁻¹]	30,0	9,0	290,0	216,0
Chloridy [mg.l ⁻¹]	20,0	1,6	107,0	39,0
Vápník [mg.l ⁻¹]	25,0	75,82	62,01	62,4
Hořčík [mg.l ⁻¹]	9,0	18,21	9,96	8,5

Obrázek 3: Chemické složení význačných pivovarských vod [13]

2.2.1.4 Kvasinky [13, 16]

Jak známo, k výrobě piva jsou používány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* Hansen a *Saccharomyces calrsbergensis* Hansen. Pro kvasinky *Saccharomyces calrsbergensis* Hansen je typické spodní kvašení, při němž se v konečné fázi kvasinky shlukují ve vločky a sedimentují na dně kvasné nádoby. Tento typ kvašení je typické pro české pivo (plzeňského typu). Optimální teplotní podmínky jsou 6-8 °C a kvašení ustává teprve při teplotě 0 °C.

Pivovarské kvasinky mají zpravidla tvar oválný, popřípadě kulatý, který se mění v závislosti na kultivačních podmínkách. Důležitou vlastností pivovarských kvasinek je flokulace a sedimentace.

2.2.1.5 Metabolismus sacharidů u kvasinek

Pro kvasnice jsou nejdůležitější živinou sacharidy, které tvoří téměř 90 % mladiny. Ve většině případů je zkvašována nejdříve glukosa, fruktosa a sacharosa, dále pak maltosa a maltotriosa. Přenos glukosy a fruktosy probíhá tzv. usnadněnou difuzí, zatímco přenos maltosy a maltotriosy vyžaduje aktivní transportní systémy.

Kvasinky za anaerobních podmínek zkvašují maltosu výhradně podle Emden-Meyerhof-Parnasova schématu. Naopak v aerobním prostředí probíhá odbourání cukru ještě podle Warburg-Dickens-Horeckerova schématu, které navazuje na pentosový cyklus.

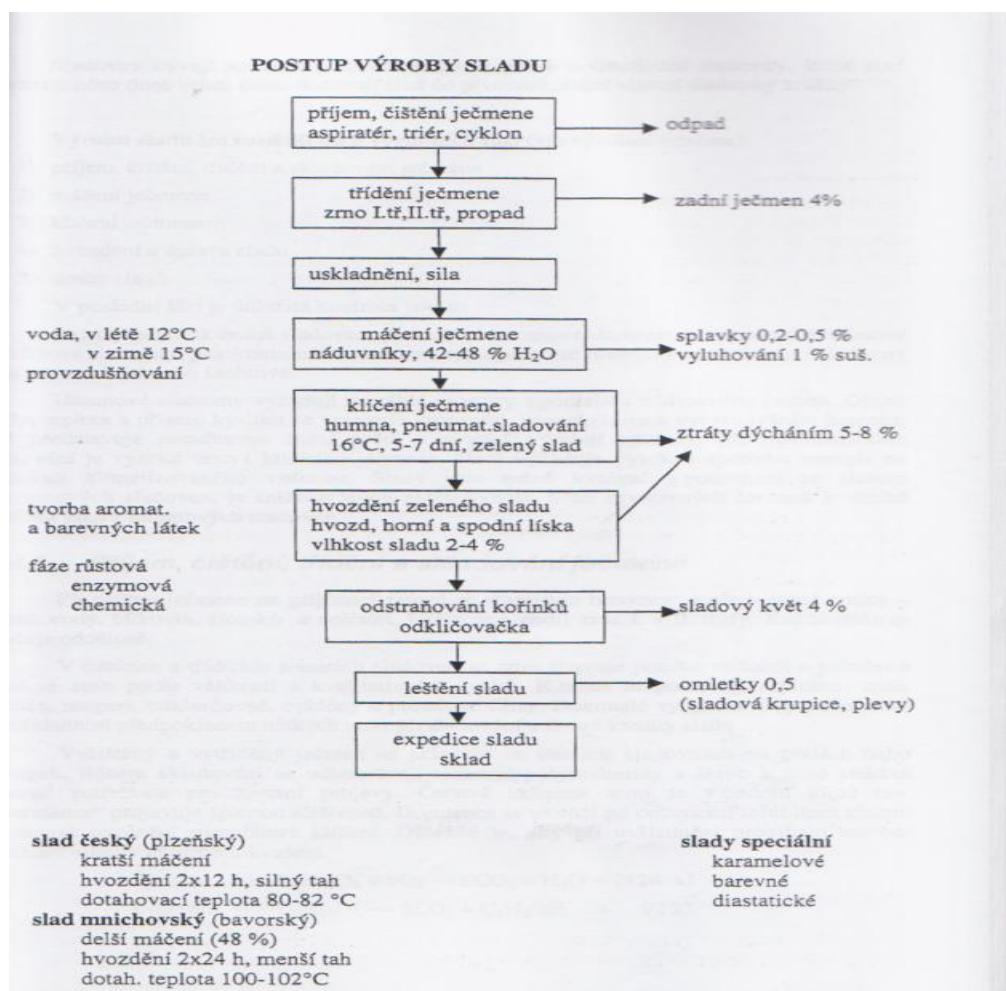
2.2.2 Sladovna

Výroba sladu je řízený proces klíčení a hvozďení, při kterém se v zrně hromadí enzymy, aromatické a barevné látky potřebné pro výrobu určitého druhu piva [17].

Sladovny bývají častou součástí pivovarů. Dále existují obchodní sladovny, které slad dodávají do pivovarů, jenž vlastní sladovny zrušili či je vůbec neměly.

Výrobu sladu můžeme rozdělit do pěti výrobních fází.

1. Příjem, čištění, třídění a skladování ječmene
2. Máčení ječmene
3. Klíčení ječmene
4. Hvozďení a úprava sladu
5. Odkličování a skladování sladu



Obrázek 4: Schéma výroby sladu [17]

2.2.2.1 Příjem, čištění a třídění ječmene

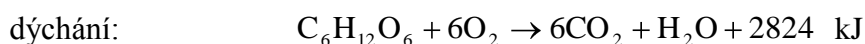
Při příjmu ječmene do košů dochází ke kontrole hmotnosti a k základnímu rozboru, jehož obsah se uvádí v kupní smlouvě. Stanovuje se zde obsah vody, bílkovin, zlomků a nečistot a podíl zrna I. a II. třídy.

Roztříděný ječmen odchází na předčištění. Čištění probíhá ve dvou stupních. Hrubé nečistoty jsou odstraněny na vibrujících sítích aspirátoru, následně se odstraňují cizí příměsi a nakonec příměsi jemné. Následně dochází k odstranění půlek ječných zrn a kulatých zrn různých plevelů na triéru.

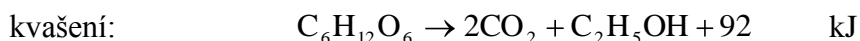
Další fází tohoto procesu je třídění. Ječmen se dělí na I. a II. třídu, dle velikosti zrn. Zrna první třídy musí být větší než 2,5 mm, z druhé třídy je to velikost v rozsahu 2,2 – 2,5 mm. Zrna o menší velikosti, než je definováno pro druhou třídu jsou nazývány propadem.

Po vyčištění a vytřídění je ječmen uložen buď na podlahových skladištích (sýpkách), nebo v silech. Skladovaný ječmen je živý organismus, který se vyvíjí a mění [13]. Během skladování dochází k odbourávání rezervních polysacharidů a škrobu a zrno získává energii potřebnou pro životní projevy.

Podle poznatků z posledních let by se ječmen měl skladovat při obsahu vody menším než 14%. Velmi důležitým faktorem u skladování ječmene je, aby probíhalo aerobní dýchání, nikoliv anaerobní kvašení



Rovnice 1



Rovnice 2

Při anaerobním kvašení dochází k narušení až usmrcení klíčků, proto je důležité, aby byl zajištěn přívod kyslíku [17].

2.2.2.2 Máčení ječmene

Cílem máčení je zvýšit řízeným způsobem obsah vody v zrně pro zahájení enzymatických reakcí a pro jeho klíčení. Dále je máčení nezbytné pro odstranění splavků, lehkých nečistot a vyloučení nežádoucích látek obsažených v zrně. Máčení je považováno za nejdůležitější úsek výroby sladu, který rozhoduje o jeho budoucí kvalitě. Při vyprání ječmene dochází k vyloučení barevných a hořkých látek, kyseliny křemičité a bílkovin z pluch.

Máčení probíhá v náduvnících. V minulosti to byly nádoby válcovitého tvaru s kónickým dnem vyrobené z železobetonu nebo kamenné. Dnes se používají náduvníky výhradně kovové, z legovaných ocelí. Máčírna může být jednodenní, tzn. máčení ječmene trvá max. 24 h. Znamená to, že v náduvníku dochází k namáčení i vymáčení. Máčírny dvoudenní, popřípadě třídní, kdy máčení může trvat 48 nebo 72 hodin, mohou být přepouštěcí nebo přečerpávací. V případě přepouštěcí máčírny jsou náduvníky umístěny pod sebou a ječmen s vodou se samospádem přepustí do náduvníku dalšího dne. Nejčastějším typem máčírny je dvoudenní máčírna, nejlépe přepouštěcí.

Při máčení je důležité provzdušňování, proto se máčecí voda 1 až 3 x denně vyměňuje a ponechá se provzdušňovací přestávka 4-6 hodin. K máčení by se měla používat čistá voda o maximální tvrdosti 6,25 mmol/l, neutrální reakce [13, 17].

2.2.2.3 Klíčení ječmene

Rezervní látky, obsažené v zrně, jsou při skladování a před zahájením skladovacího procesu ve stabilní vysokomolekulární formě. Následným transportem a činností enzymů pomocí vody dojde k jejich odbourání na nízkomolekulární produkty. Tato druhá hlavní fáze výroby sladu se nazývá klíčení [13, 18].

Cílem sladařského klíčení je aktivace a syntéza enzymů a docílení požadovaného rozluštění zrna. Důležitým faktorem je, aby biologické pochody byly vyvážené, aby aktivace enzymů nebyla příliš vysoká a nedocházelo tak ke ztrátám v obsahu extraktu.

V průběhu klíčení pozorujeme:

- a) tvorbu enzymů a přeměnu látek
- b) růstové změny a projevy růstu

Tvorba a aktivace enzymů je nejdůležitějším procesem při klíčení. S výjimkou α -amylasy, která není obsažena v ječmenu, jsou ostatní enzymy v malé míře v ječmenu již přítomny. Nárůst aktivity je iniciován prostřednictvím činnosti **fytohormonů**. Tyto hormony se skládají z giberelové kyseliny a dalších příbuzných látek, které putují přes endosperm do aleuronové vrstvy. Zde dochází k vzniku nových volných aminokyselin a enzymů. Výjimkou je enzym β -amylasa, který není tvořen v aleuronu, nýbrž volně v endospermu.

Amylasy jsou nepochybně nejdůležitějšími enzymy sladu. Jejich působením se štěpí rezervní škrob endospermu na jednoduché cukry za tvorby energie.

α -amylasa hraje důležitou roli při výrobě nealkoholického piva. Největší množství tohoto enzymu je vyprodukováno od druhého do čtvrtého dne klíčení. Tvorba β -amylasy je bezprostředně spojena s dýcháním v prvním dni klíčení. Proto je pro její tvorbu důležité dostatečné provětrávání již v první fázi klíčení.

V ječmeni musí proběhnout posklizňové dozrávání, které u našich ječmenů trvá při standardních podmínkách 6 až 8 týdnů. V pneumatických sladovnách se ječmen běžně vymáčí s obsahem vody okolo 42 %, v humnových sladovnách okolo 44 %. Ihned po obeschnutí ječmene dojde na humnech k pokropení a obrácení. Při výrobě světlého sladu plzeňského typu je obvyklý obsah vody 43 – 45 %, pro výrobu bavorského piva 48 – 50 %. Obsah vody musí být v souladu s teplotou při klíčení a s délkou klíčení. Těmito faktory je výrazně ovlivněna výsledná jakost sladu [13, 17].

2.2.2.4 Hvozďení

Hvozďení je konečnou fází výroby sladu. Cílem hvozďení je převést zelený slad s vysokým obsahem vody do skladovatelného a stabilního stavu, zastavit životní a luštící pochody v zrně a vytvořit aromatické a barevné látky, charakteristické pro druhy sladu. Aby byl získán slad se všemi požadovanými vlastnostmi, technologický proces na hvozdech probíhá pomaleji než by trvalo běžné sušení, teploty se zvyšují postupně. Podle toho lze při hvozďení rozlišit dvě různé fáze:

- a) Fáze předsoušení sladu
- b) Fáze zvyšování teplot a dotahování sladu

První fáze – **předsoušení sladu**, je fáze kdy dochází ke snížení obsahu vody z 40 – 45 % na 10 – 12 % do tzv. **prošlápnutí lísky**. Tato fáze předsoušení sladu by měla u světlých sladů probíhat při teplotě vstupujícího vzduchu max. 55 °C.

Druhá fáze je velmi důležitá pro tvorbu aromatických a barevných látek, charakterizujících druh sladu. Dochází zde k odsoušení vázané vlhkosti ze zrna [13].

Z hlediska biochemických a chemických změn můžeme hvozďení rozdělit do tří fází:

- a) Růstová fáze
- b) Enzymatická fáze

c) Chemická fáze

Ve fázi růstu je obsah vody stále vysoký, teplota nepřekročí 40 °C. Tyto podmínky jsou příznivé pro luštění zrna a pro růst kořínků a stříšky.

Při fázi enzymatické se teplota pohybuje v rozmezí 40 – 60 °C, vlhkost zrna se tak snižuje na 20 %. Dochází k zastavení růstu kořínků a stříšky, ale pokračují enzymatické reakce v zrně. Fáze chemická se vyznačuje obsahem vody pod 10 % a teplotou nad 60 °C. Zároveň v zrně probíhají chemické reakce za vzniku barevných a aromatických látek charakteristických pro daný slad. Mezi tyto látky patří barevné a aromatické látky bezdusíkaté – **melaniny** a látky obsahující dusík – **melanoidy**. V této třetí fázi, dochází k poškození enzymatické aktivity tzv. dotahovacími teplotami, u světlých sladů nižšími 80 – 82 °C, u bavorských sladů vyššími 100 – 105 °C. Nejvíce dochází k poškození amylázy, zejména β -amylasy [17].

Zelený slad se hvozdí na hvozdech, dříve vícelískových, dnes se využívají jednolískové hvozdy [13, 17].

2.2.2.5 Odkličování a skladování sladu

Na hvozzení navazuje odkličování sladu, při němž se slad zbaví kořínků, dochází k leštění sladu, zbavení prachu a poškozených zrn. Při vytvoření vhodných podmínek může slad být skladován až dva roky [17].

Odkličování probíhá na odkličovačce. Je to zařízení složené z válce, v němž jsou na hřideli upevněny růžice s odkličovacími perutěmi. Perutě mohou být nahrazeny šnekovými dopravníky. Pomocí perutě, popřípadě šneku dochází k ulamování kořínků, které se označují jako sladový květ. Sladový květ, rozdrčený slad a pluchy vypadávají perforovaným pláštěm do spodní části odkličovačky, horní část odkličovačky je odsávána a tím je slad zbavován prachu a zbytku kořínků. Následně je odkličený slad vážen a uskladňován do předzásobního sila.

Slad je uskladňován do sil nebo na sladovou půdu, kde se nechává odležet (dozrát) 4 až 6 týdnů. Při tomto dozrání dochází k zvlhčení pluchy a fyzikálně chemickým změnám v endospermu. Neodleželý slad způsobuje při zpracování v pivovaru potíže při scezování, kvašení a také varné výtěžky jsou nižší.

Před samotnou expedicí je nutné zbavit slad prachu a nečistot, popřípadě poškozených zrn. Čištění sladu probíhá na leštičkách, kde dochází zároveň k vyleštění sladu. Expedice probíhá podle požadavků odběratele, může být expedován volně ložený, pro menší a speciální odběratele pytlovaný [13].

2.2.2.6 Druhy sladů

Slad ovlivňuje chemické složení piva, organoleptické vlastnosti a koloidní stabilitu. Speciální slady jsou používány na výrobu tmavých a speciálních piv nebo při úpravě složení sladiny, v případě kdy byly použity náhražky. Od sladů běžných se liší enzymovou aktivitou, kyselostí, barvou a vůní. Speciální slady jsou karamelové, barevné, diastatické a slad pšeničný.

- a) Karamelové slady – vyznačují se vysokým obsahem aromatických a barevných složek. Nejdříve podmínky při výrobě vedou k částečnému ztekucení a úplnému zcukření endospermu při 70 – 75 °C a poté pokračuje vlastní karamelizační proces. Při teplotě 120 – 180 °C dle druhu sladu (světlý, střední a porterový karamel). Karamelové slady se používají na výrobu tmavých speciálních piv. Dle barvy se dělí na světlý, polotmavý a tmavý karamel.

- b) Barevné slady - jsou připravovány z hotového sladu, který se po ovlhčení nechá zcukřit při 60 – 80 °C a poté je teplota postupně zvyšována na 200 – 225 °C. Účinkem těchto vysokých teplot se mění fyzikálně – chemické vlastnosti. Tento slad se využívá při výrobě tmavých pív.
- c) Diastatické slady – vyznačují se vysokou enzymovou aktivitou a je vyroben z ječmenů a pšenice lehčího zrna s vysokým obsahem bílkovin (14 % a více). Ječmen je sladován s vyšším obsahem vody (46 – 48 %) při teplotách do 14 °C. Hvozdnění probíhá rovněž při nízkých teplotách, dotahovací teplota nepřekračuje 65 °C. Využívá se při zpracování enzymově chudých sladů.
- d) Pšeničný slad – je využíván při výrobě speciálních tzv. „bílých“ pív nebo v pekárenství. Pšenice snadno přijímá vodu, je sladována do domočení 43 %. Zelený slad je méně kyprý, obtížně se hvozdí, dotahovací teplota do 75 °C. Obsah vody okolo 5 % [17].

Do určité míry je možné nahrazení sladu sladovými náhražkami. Tyto náhražky jsou definovány jako škrobové nebo cukerné surogáty. Hlavním důvodem použití těchto náhražek bývá snížení surovinových nákladů na výrobu piva [13].

2.2.3 Výroba mladiny

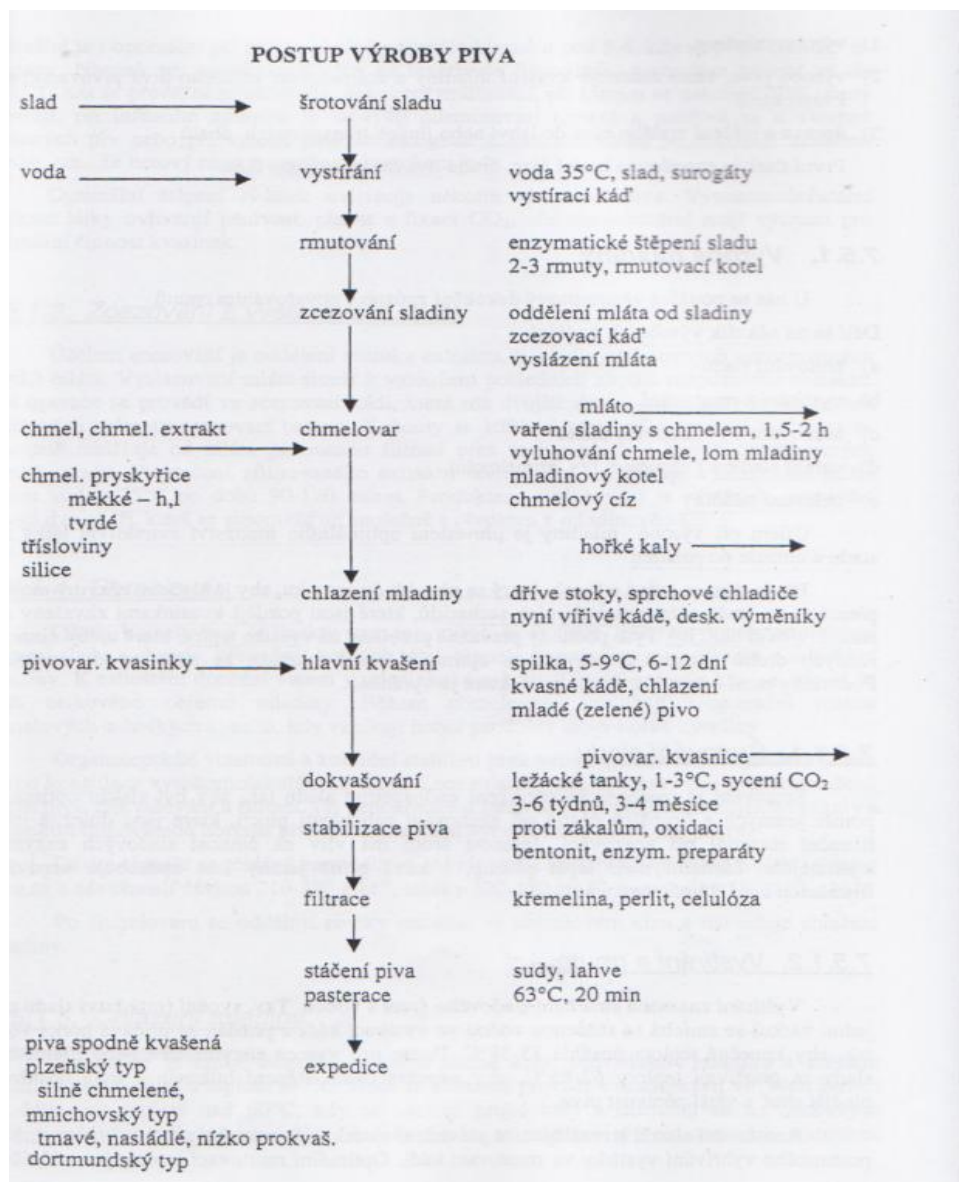
Pivo je slabě alkoholický nápoj vyráběn ze sladu, vody a chmele. Jak se vyrábí slad, bylo popsáno v předchozí kapitole, nyní je zapotřebí popsat výrobu samotného piva (*Obrázek 17*).

2.2.3.1 Čištění a šrotování sladu [13, 17]

Cílem varního zpracování je převést za pomoci enzymů extraktivní látky sladu do roztoku. Šrotování sladu je proces čistě mechanický a zdánlivě jednoduchý proces. Složení šrotu ovšem zásadním způsobem ovlivňuje proces rmutování, scezování a varní výtěžek. Dochází k rozdrčení endospermu sladu tak, že je získán optimální poměr jemných a hrubších částic při zachování celistvosti pluch, které jsou důležité jako filtrační materiál při scezování. Ke šrotování dochází v tzv. šrotovníku.

Slad je dopravován ze sil mechanicky, popřípadě pneumaticky a dochází k čištění sladu. K čištění jsou využívány aspirátory, nebo dva samostatné, za sebou řazené stroje – čistička a odkameňovač. Šrotovníky pro suché šrotování jsou nejpoužívanějším zařízením pro šrotování sladu. Podle počtu válců rozlišujeme dvouválcové až šestiválcové šrotovníky. Výkon šrotovníku musí umožnit sešrotování potřebného množství sladu na várku za 1,5 až 2 hodiny.

Jemnost šrotu má vliv na činnost sladových enzymů, k jemnějším částicím mají lepší přístup. Na druhou stranu velmi jemný šrot způsobuje ucpání filtračních kanálků při scezování.



Obrázek 5: Schéma výroby piva [17]

2.2.3.2 Vystírání a rmutování

Vystírání znamená smíchání sladového šrotu s vodou. Tzv. sypání se míchá se studenou vodou ve vystírací kádi a později se přidává horká voda tak, aby konečná teplota dosáhla 35 – 38 °C. Pouze pro vysoce enzymatické nebo přelustěné slady se používají teploty 62 – 65 °C, aby nepokračovalo štěpení bílkovin a byla dosažena plnější chuť a větší pěnivost piva [17].

Rmutování slouží k rozštěpení a převedení extraktu do roztoku působením enzymů za postupného vyhřívání vystírky ve rmutovací kádi. Část extraktu 15 – 17 % je přímo rozpustná a při rmutování se vyloučí do vody pouhým účinkem míchání a zvýšenou teplotou. Větší část zejména vysokomolekulárních látek obilného endospermu je možno převést do roztoku až po jejich rozštěpení katalyzovaném sladovými enzymy. Tyto látky ovlivňují pěnivost, plnost a fixaci CO₂. Hlavním požadavkem rmutovacího postupu je převedení do roztoku škrob i vhodný podíl bílkovin a dalších látek [13].

Optimální rmutovací teplota je 55 – 60 °C, pH rmutu by nemělo klesnout pod hodnotu 5,4. Nedodržením podmínek může dojít k inaktivaci enzymů, zejména α-amylasy jsou

citlivé na snížení pH pod danou hodnotu. V případě přesáhnutí teplotní hranice dochází k inaktivaci β - amylasy. Považením rmutu dojde k zmazovatění a ztekucení škrobu též v hrubých, méně rozluštěných podílech šrotu a současně se zničí ve rmutu přítomné enzymy.

Rmutovací soustava je složena z jedné až čtyř nádob, záleží na technologii procesu. Při dekokčním rmutování je vana nejčastěji vybavena dvěma nádobami, nebo dvěma stejnými rmutovacími pánvemi [17].

2.2.3.3 Scezování mladiny

Odrmutované dílo lze popsat jako hustou suspenzi mláta ve vodném roztoku extraktivních látek. Úkolem scezování je co nedokonalejší oddělení těchto dvou látek od sebe. V první fázi dochází k scezení s využitím filtrační vrstvy mláta a získání zadržené sladiny tzv. „**předek**“ ve druhé fázi dochází k promytí mláta horkou vodou 75 °C po dobu 90 – 120 minut. Toto promytí se v pivovarské terminologii nazývá „**vyslazením**“ a získá se tak sladina zvaná „**výstřelky**“. Obě fáze probíhají ve scezovací kádi, která má dvojité dno a systém odvodných trubek. Kohouty trubek se střídavě otevírají a uzavírají a dochází tak k postupnému oddělení sladiny od mláta [13].

2.2.3.4 Chmelovar

Sladina získaná scezováním se v mladinové pánvi vaří s chmelem po dobu 90 – 120 minut, u moderních systémů je tato doba zkrácena na 65 – 80 minut. Získaným produktem je horká mladina.

Během varu sladiny s chmelem dochází k řadě významných technologických operací. V první řadě dochází k odpaření přebytečné vody, získá se tak mladina o požadované koncentraci. U klasické mladinové pánve s topným dnem se obvykle požaduje celkový odpar 8 – 10 % a doba varu 90 – 120 minut. Dalším důležitým faktorem je pokles hodnoty a nárůst barvy. V průběhu chmelovaru klesá hodnota pH o 0,15 – 0,25. Tento pokles příznivě ovlivňuje koagulaci bílkovin. Dále tmavnutí podporuje vyšší pH a přítomnost většího množství polyfenolů. Vznikající látky bývají označovány jako produkty Maillardových reakcí. Zároveň dochází k produkci redukujících látek, které jsou označovány jako reduktony. S rostoucím množstvím těchto látek se zvyšuje koloidní a chuťová stabilita piva [13]. Dávka chmelu se přidává zpravidla na třikrát podle kvality a typu piva. Světlá výčepní piva se u nás chmelí dávkou 210 – 280 g/hl, ležáky 320 – 450 g/hl, tmavá piva 160 – 280 g/hl. Po chmelovaru dochází k oddělení zbytků chmele ve chmelovém cízu [17, 18].

2.2.3.5 Chlazení mladiny

Z mladiny je nutné odstranit hrubé a jemné kaly, provzdušnit mladinu a zchlazení mladinu na kvasnou teplotu 5 – 7 °C. Chlazení je prováděno v uzavřených vířivých kádích zpočátku při teplotě nad 60 °C, kdy dochází k usazování hrubých kalů. Poté následuje dochlazení na deskových protiproudových výměnících tepla. Před kvašením se mladina sytí za sterilních podmínek kyslíkem (5 – 6 mg/l), který je důležitý pro činnost kvasinek. Obsah extraktu v mladině by měl odpovídat druhu vyráběného piva [17].

2.2.4 Výroba piva

Výroba piva se dělí na:

- a) hlavní kvašení
- b) dokvašování a zrání

2.2.4.1 Hlavní kvašení

Cílem kvašení piva je řízená přeměna sacharidů na alkohol a CO₂ za současného vytváření vhodných organoleptických vlastností piva. Průběh fermentace je závislý na složení mladiny, druhu použitých kvasnic, zákvasné dávce, teplotě kvašení, tlaku, objemu a tvaru nádob.

Při hlavním kvašení proběhne přeměna zkvasitelných sacharidů na etanol, oxid uhličitý a vedlejší produkty při anaerobním kvašení:



Rovnice 3

Zchlazená mladina se zkvašuje u nás častěji kvasinkami spodního kvašení naopak při nízkých teplotách 5 – 12 °C. Celková doba hlavního kvašení bývá 6 – 10 dní. Nejmodernějším zařízením jsou cylindrokónické nerezové tanky umístěné v místnosti zvané spilka. Počet dnů kvašení odpovídá počtu stupňů mladiny. Na konci hlavního kvašení dochází k sedimentaci kvasinek na dno kvasné kádě. Kvasinky se po odčerpání piva odebírají a propírají studenou vodou a znovu je lze nasadit (až 5x). Vzniklý oxid uhličitý je odváděn do stáčírny, kde je využíván ke stáčení piva [17].

2.2.4.2 Dokvašování a zrání

Dokvašování a zrání piva probíhá v ležáckém sklepě v ocelových sudech nebo v nerezových tancích. Mladé pivo dokvaší při 1 – 3 °C, číří se, zraje a sytí CO₂ na optimální hodnotu 0,5 %. Oxid uhličitý dodává pivu plnost a říz. Doba tohoto procesu trvá 14 dní. Poté je nutná fixace oxidu uhličitého. Proto celková doba ležení trvá u 10° světlých piv 3 týdny, u ležáků 55 – 70 dní, u speciálních a silně chmelených 3 – 4 měsíce [17].

2.2.4.3 Filtrace piva

Filtrace by měla pivo upravit tak, aby nedocházelo ke změně čirosti piva v transportním obalu. Dochází k oddělování zákalotvorných částic a zbylých kvasničných buněk. Filtrační materiály jsou práškovité substance, jako například křemelina nebo perlity, které se naplavují na filtrační přepážku [13].

Křemelina se skládá z drobných skořápek pravěkých rozsivek z oxidu křemičitého. Perlity jsou křemičitany hlinité vulkanického původu, které v přírodním stavu obsahují 2 – 3 % vázané vody. Dnes nejčastěji používané naplavovací filtry lze rozdělit na deskový filtr, svíčkový filtr a síťový filtr s vodorovnými síty. Základní náplav se provádí hrubou křemelinou, která je naplavována vodou, dokud není vytvořena souvislá vrstva. Celý proces je opakován ještě jednou. Z důvodu udržení průtočnosti filtrátu základním náplavem, přidává se směs křemeliny k filtrovanému pivu. Předpokladem úspěšné křemelinové filtrace je vyloučení tlakových nárazů a rychlostí změny průtoku filtrovaného piva po celou dobu filtračního cyklu. U dobře prokvašených piv se spotřeba křemeliny pohybuje kolem 60 – 120 g na 1 hl piva.

2.2.4.4 Stáčení piva

V současné době dochází ke stáčení více než 50 % vyrobeného piva. Pivo se stačí v stáčírně, do níž patří přetlačný sklep, vlastní stáčírna, pomocné provozy, sklady prázdných a plných láhví [13]. Jako transportní nádoby jsou používány sudy, láhve, plechovky nebo tanky. Plechovky se s výhodou využívají pro jejich světelnou nepropustnost a lehkost, negativní zde může být kovová příchut'. Současná teplota pasterizace je 62 °C po dobu 1 minuty, nejčastěji v tunelových nebo ponorných pastech, aby byla zajištěna biologická stabilita piva [17].

Některé pivovary, zejména menší s výhodou místo pasterace využívají tzv. mikrofiltrace. Mikrofiltrace je sice technicky náročnější, ale vůči pivu méně drastická. Na konci procesu je totiž pivo při zachování teploty 2 °C přefiltrováno přes speciální mikrobiální filtr, na kterém dochází k zachycení všech mikroorganismů. Jsou tedy zachovány mnohé nutriční parametry, které by byly použitím pasterace zničeny.

2.3 Výroba piva nealkoholického

Podle legislativy platné v Evropské unii, tedy i v České Republice, je nealkoholické pivo výrobek s obsahem alkoholu do 0,5 objemových procent. Jako nízkoalkoholické je pak označené pivo s obsahem alkoholu v rozmezí 0,6 – 1,2 %.

V USA výrobky s obsahem alkoholu pod 0,5 % alkoholu nesměly nést název pivo, ale musely se označovat jako lehký sladový nápoj (light malt beverage). Obdobně je tomu v Kanadě. V Japonsku jsou tato piva označována jako nápoj podobný pivu či chutnající jako pivo (beer taste drink) [19].

2.3.1 Základní způsoby výroby nealkoholického piva

V současné době při výrobě nealkoholických piv dominují tři způsoby:

- a) Odstranění etanolu z piva vyrobeného tradičním způsobem
- b) Přerušením, nebo omezením kvašení
- c) Použitím mutantních, nebo jinak upravených kmenů pivovarských kvasinek

2.3.2 Evaporační membránové techniky

Pro odstranění etanolu z piva vyrobeného tradiční technologií je k dispozici řada postupů [19, 20].

- a) *Destilace etanolu*
- b) *Reverzní osmóza*
- c) *Odpar etanolu*
- d) *Dialýza piva*
- e) *Extrakce piva fluidním oxidem uhličitým*
- f) *Sprejové sušení piva*
- g) *Difúze*
- h) *Frakční krystalizace či lyofilizace*

2.3.2.1 Difúze

Na trhu se výrazně prosadila difúze alkoholu přes membrány, protože nedochází k termické zátěži na produkt. Ovšem z ekonomického hlediska se vakuová destilace jeví jako výhodnější způsob odstranění alkoholu, jelikož pro dialýzu piva jsou potřeba membrány a vysokotlaké pumpy [19].

2.3.2.2 Odpar etanolu

Při tomto procesu teploty nepřesahují 30 – 45 °C, takto nízkými teplotami dochází jen k minimální změně barvy a chuti piva. Odalkoholizovaná část piva má vyšší koncentraci extraktu původní mladiny (stupňovitost) než původní výrobek. Z tohoto důvodu se pivo ředí odplyněnou vodou na původní hodnotu obsahu extraktu.

Po odstranění etanolu a naředění zraje výrobek v ležáckých nádobách. Následují filtrace, stabilizace a pasterace piva.

2.3.3 Limitovaná fermentace

Tato metoda je v současné době používanější metodou pro výrobu nealkoholických piv. Jde o modifikaci pivovarského fermentačního procesu, při kterém dochází k nízké produkci etanolu (méně jako 0,5 obj.%). Principem je potlačení metabolismu kvasinek. Nejrozšířenějším příkladem limitované fermentace je metoda „Cold Contact Process“ neboli CCP. Podstatou metody je nasazení velkého množství kvasinek (135 mil. buněk/ ml) a fermentace několik dní. V momentě dosažení požadované koncentrace etanolu dojde k přerušení fermentace odstraněním kvasinek. Také tomuto pivu je vytýkána prázdná mladinová chuť, jsou za ni zodpovědné aldehydy mladiny [20].

2.3.4 Mutantní kvasinky

Pokusy s geneticky manipulovanými kvasinkami jsou zatím velmi opatrné, nasazení rekombinantních kmenů se neslučuje s potravinářskou legislativou u nás. Proto jedinou možností, jak zasáhnout do genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* zůstává mutagenese. Tyto mutace jsou buď indukované, nebo vyvolané prostředím. Kmeny obsahující mutace v genech pro enzymy z cyklu trikarboxylových kyselin (TCA) mají schopnost produkovat snížené množství etanolu na úkor tvorby kyselin, které jsou meziproduktem TCA cyklu, zde jsou však produktem terminálním [20, 21].

2.4 Biologicky aktivní látky v pivu

2.4.1 Antioxidanty

Mezi přirozené antioxidanty se řadí především sekundární metabolity obsažené převážně ve vyšších rostlinách, které likvidují volné radikály způsobující řadu onemocnění. Jako antioxidanty mohou být označovány všechny látky, které při pH 7 vykazují nižší potenciál než +0,816 mV [22].

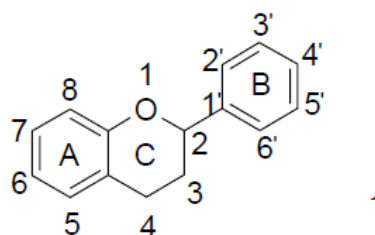
Řada přirozených antioxidantů patří do skupiny vitamínů. Příkladem může být hydrofilní kyselina askorbová, vitamíny B₂ a B₁₂ nebo lipofilní prekurzory vitamínu A – karotenoidy, xanthofyly a skupina vitamínu E - tokoferoly. Mezi antioxidanty patří i řada bioflavonoidů, což jsou polyfenolické antioxidanty. Do této skupiny patří například flavonoly a flavony, flavanoly, katecholy, fenolkarboxylové kyseliny, polyfenoly chalkonové řady, prenylovaný flavonoid xanthohumol (XN) a jeho izomer flavanon isoxanthohumol (IX) [12]. XN byl izolován již v roce 1892, pojmenován a získán ve větším množství byl a. v roce 1913. Pozornost odborníků si však tato látka zaslouží až nyní, s rozvojem biochemických věd a výzkumu zaměřeného na lidské zdraví [23].

2.4.1.1 Polyfenoly

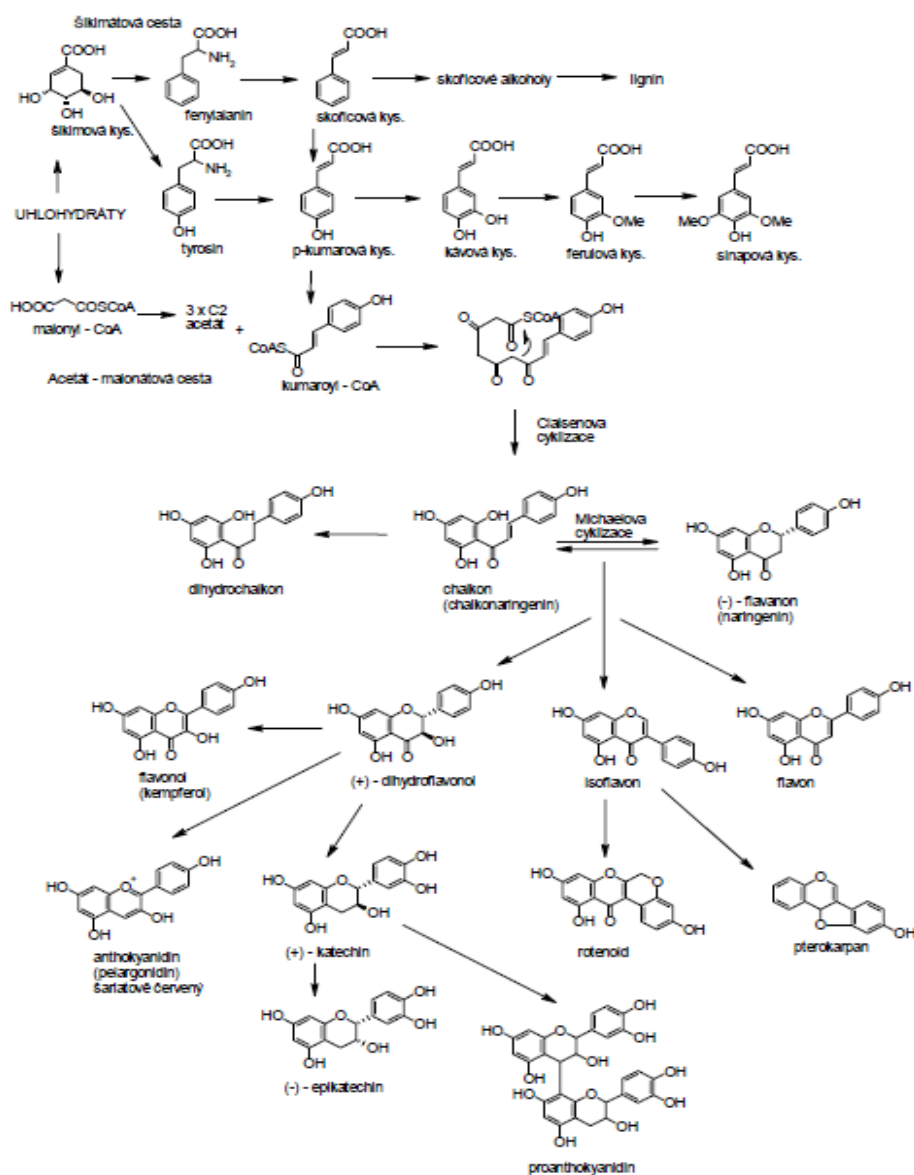
Polyfenolické látky v pivu mají svůj původ především z chmele a chmelových výrobků. V pivovarském procesu jsou uplatňovány spolu s polyfenolickými látkami sladu, které mají podobné chemické složení, ale rozdílné poměry jednotlivých skupin derivátů [13]. Vliv polyfenolů se projevuje zejména na chemicko-fyzikální stabilitě piva, formování pěny a odolnosti proti stárnutí a oxidaci piva. Tato skupina látek má silné antioxidační, antikarcinogenní, protimikrobiální, protitrombozní a další účinky pozitivně ovlivňující zdraví člověka. Obsah polyfenolů pocházejících z chmele se pohybuje v rozmezí mezi 20 – 30 %, ostatní polyfenolické látky pochází ze sladu [23].

2.4.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejvíce zastoupenou skupinou polyfenolických látek. Zastoupení flavonoidů v potravinách je ovlivněno mnoha faktory, vedle druhu, odrůdy a stanoviště rostliny to celý soubor vnějších podmínek v průběhu vegetace. Na syntézu flavonoidů má značný vliv sluneční světlo. Čím je intenzita záření vyšší, tím více se flavonoidních látek nakumuluje[23]. Jejich struktura je odvozena od heterocyklického flavanu. Majoritními složkami jsou zde katechin, epikatechin a jejich polymery proanthokyanidy, dále flavonoidy rutin, kvercetin a kempferol.



Obrázek 6: Základní struktura flavanu [23]



Obrázek 7: Schéma biosyntézy flavonoidů [23]

Chmelové flavonoidy jsou obvykle rozdělovány do čtyř podskupin: na chalkony, flavonoly, flavanoly a anthokyanidiny. Chalkony jsou prvními intermediáty v biosyntéze flavonoidů vznikajícími reakcí mezi kyselinou kumarovou a třemi acetátovými jednotkami, katalyzovanou enzymem chalkonsynthasou. Flavanonová struktura vzniká izomerací chalkonu enzymem chalkonisomerasou a její následná oxidace vede k flavonolům, kdežto redukce k flavanolům. Flavanolová polymerace může dále vést k dobře známým proanthokyanogenům. V tomto případě se vytváří vazba mezi C-8 kruhu A a C-4 kruhu C. Krátké polymery s méně ne. 10 jednotkami jsou obvykle označovány jako oligomery, kdežto dlouhé řetězce jsou známy jako taniny [23, 24].

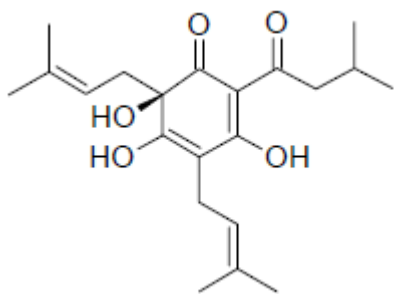
2.4.2 Hořké chmelové látky

Jednou z charakteristických a požadovaných senzorických vlastností piva je hořkost. Zdroj této hořké chuti jsou látky obsažené v chmelu – pryskyřice. Ty přecházejí během chmelovaru do mladiny a následně do hotového piva [25]. Hlavní skupinou těchto pryskyřic jsou α -hořké kyseliny. Nejdůležitější z hlediska chuťových účinků a bakteriostatických vlastností jsou tzv. isosloučeniny vznikající z hořkých kyselin během vaření piva [12].

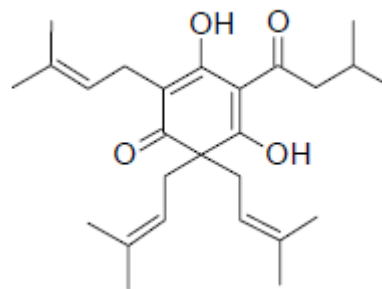
Vjem hořké chuti v ústech vyvolává bez ohledu na typ hořkosti zvýšenou sekreci trávicích šťáv a tím i chuť k přijímání potravy. Silná intenzita hořkosti piva českého typu podporuje proces trávení a je zdrojem podnětů pobízejících ke konzumaci tuhé potravy i tekutin. Tento fyziologický mechanismus je podporován mírně drsným, a. drsným charakterem hořkosti. Drsnější hořkost déle ulpívá v ústech a tím i déle dráždí chuťové receptory. Naproti tomu vjem velmi jemné, až jemné hořkosti daleko rychleji vymizí a má tudíž daleko nižší fyziologickou účinnost [26].

V současné době je stále více preferováno používání průmyslově připravených výrobků, v podobě různých upravených extraktů, které nahrazují chmel v „hořké“ části pivovarské technologie. Používají se také přípravky s modifikovanými analogy iso- α -hořkých kyselin. Pro výrobu piva je možno použít nejen přírodní preparáty, ale také upravené chmelové výrobky, které se v původní surovině, chmelu, vůbec nevyskytují. Tyto chemicky modifikované výrobky poskytují celou řadu technologických výhod, zlepšení pěnivosti, hořkosti a senzorické stability, ovšem jejich použitím ztrácí pivo svůj charakter „přírodního“ nápoje [25].

Mezi hořké kyseliny patří α -hořké kyseliny, skládající se především z humulonu, kohumulonu a adhumulonu. β -hořké kyseliny (lupulon, kolupulon, adlupulon), nespecifické měkké pryskyřice (humulinony, luputryony) a tvrdé pryskyřice (humulinové a hulupinové kyseliny) jsou dalšími součástmi chmele. Nejvíce je v samičích květech obsažen humulon (2.6 %) a lupulon (8.12 %), vzájemný poměr hořčin a jejich složení závisí na odrůdě chmelu.

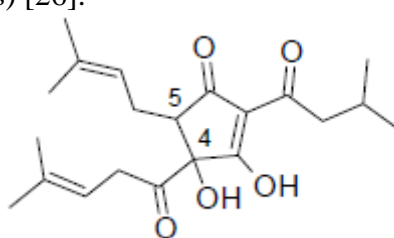


Obrázek 8: Humulon



Obrázek 9: Lupulon

Isohumulony moduluji hladiny krevních lipidů cestou aktivace PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) [26].



Obrázek 10: Isohumulon

2.4.3 Proteiny

Mezi kvalitativní a kvantitativní znaky charakterizující pivo patří bohatá, hustá a dlouhotrvající pěna. Z fyzikálního hlediska se jedná o disperzi plynu v kapalině. K faktorům pozitivně ovlivňujících tvorbu a stabilitu pивní pěny patří především bílkoviny, resp. bílkoviny s hydrofobním charakterem [27]. Proteiny obsažené v pивu můžou být příčinou tvorby zákalu [28]. V pивu je obsaženo 3 – 5 g/l čistých bílkovin, přičemž 85 % z těchto bílkovin pochází ze sladu a 15 % z pivovarských kvasinek. Obsah aminokyselin se pohybuje v rozmezí 300 – 500 mg/l, je zde obsažena téměř celá řada esenciálních aminokyselin [18].

2.4.4 Sacharidy

Hlavní části extraktu pивa jsou sacharidy. Nejdůležitějšími sacharidy jsou dextriny, štěpné produkty škrobu, které jsou nezkvasitelné kvasinkami. Dále jsou to potom v menší míře některé oligosacharidy a monosacharidy. Ze zkvasitelných cukrů je zde nejvíce zastoupena maltosa a maltotriosa. Gumovité látky představované zejména pentosany a β-glukany zvyšují viskozitu pивa [13].

Zdrojem sacharidů je ječmen a chmel. V ječmeni je zastoupena celá řada sacharidů, nejvíce je zde zastoupený škrob (58-65 %), pentozany (7-11%), galaktoxytan (2-2,5 %), maltosa, rafinosa, invertovaný cukr, sacharosa. V chmelu je obsaženo 3,5 % glukosy a fruktosy a malé množství pentozanů. Rovněž bylo dokázáno 12 – 14 % pektinů, jehož část se udržuje i v pивu [18]. Celkový obsah sacharidů v pивu se pohybuje okolo 28 g/l a je nesporně jedním z hlavních zdrojů energie.

2.4.5 Vitamíny, provitamíny, minerální a stopové prvky

Vitamíny jsou látky patřící k základním složkám lidské potravy. Jejich funkce v lidském organismu je katalýza biochemických reakcí. Z praktického hlediska lze vitamíny rozdělit na dvě skupiny, rozpustnou v tucích (A, D, E, F, K) a rozpustnou ve vodě (B, C, H). [12]

Pivo je jediným nápojem, který obsahuje významná množství vitaminů, oproti třeba vínům nebo alkoholickým nápojům. V pivě se nachází široká škála vitaminů - všechny vitaminy skupiny B (pyridoxin, riboflavin, kobalamin, pantothenát, foláty, thiamin a biotin, niacin. Denní potřeba obou těchto vitaminů je při konzumaci 1 l pивa kryta asi ze 17 %. Stejně procento je pokryto v případě biotinu, což je vitamin H. Jeden litr pивa kryje dále 13 % denní potřeby niacinu, 8 % potřeby kyseliny pantothenové (vitamin B5) a zhruba 10 až 45 % folátů (neboli solí kyseliny listové, vitamin B11) [29].

Kyselina L- askorbová je významný antioxidant, potřebný pro metabolismus aminokyselin, vstřebávání železa, vývoj kostí, zubů a chrupavek. Ze surovin využívaných na výrobu pивa má největší obsah vitamínu C ječmen [13, 29].

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo stanovit obsah charakteristických biologicky aktivních látek v nealkoholickém pivu. V rámci práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- rešerše zaměřená na historii a specifika technologie nealkoholického piva a na přehled aktivních látek v pivu
- optimalizace metod stanovení látek fenolické povahy a dalších parametrů - pivovarských charakteristik, proteinů, vitamínu C a celkové antioxidační aktivity
- analýza antioxidačních parametrů u skupiny vzorků nealkoholických piv od různých výrobců
- vyhodnocení a srovnání výsledků.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje a pomůcky

4.1.1 Standardní chemikálie

Kyselina L – askorbová - Sigma–Aldrich (SRN)
(-)-Katechin - Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina gallová - Sigma-Aldrich (SRN)
Rutin hydrát, 95% - Sigma-Aldrich (SRN)
Morin hydrát - Sigma-Aldrich (SRN)
Luteolin - Sigma-Aldrich (SRN)
Kvercetin dihydrát, 98%, HPLC - Sigma-Aldrich (SRN)
(±)-Naringenin approx. - Sigma-Aldrich (SRN)
Katechin gallát - Sigma-Aldrich (SRN)
Epikatechin - Sigma-Aldrich (SRN)
Epikatechin gallát - Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina ferulová p.a. - Fluka, Sigma-Aldrich (SRN)
Kyselina chlorogenová 95% - Sigma-Aldrich (SRN)

4.1.2 Chemikálie pro elektroforézu

β–merkapt ethanol, Serva (SRN)
Deionizovaná voda ReadyPrep proteomic grade water, Bio-Rad (USA)
Experion Pro260 Analysis Kit, Bio-Rad (USA)

4.1.3 Ostatní chemikálie

Kyselina chlorovodíková p.a., 35% - Lachema (ČR)
Ethylacetát p.a. - LachNer (ČR)
„Total Antioxidant Status kit“ - Randox Laboratories Ltd. (USA)
2,6 - dichlorindofenol p.a.- Sigma-Aldrich (Německo)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

4.1.4 Přístroje, pomůcky

Analytické váhy - Boeco (Německo)
pH-metr - HI221 Calibration Check, Microprocessor pH meter, Hanna instruments (USA)
Ultrazvuk - PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)
Spektrofotometr - Helios δ, Unicam (VB)
Vortex - Genius 3, IKA Vortex (SRN)
Předvážky - Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH (SRN)
Filtry - Stříkačkový filtr PROFIL 25 mm, PTFE, porozita 0,2 μm
Centrifuga - U-32-R, Boeco (SRN)
Mikropipety - BioHit Proline (Finsko)
Mikropipety - Discovery (SRN)

Sestava HPLC/MS (Thermo Scientific, USA)

Termostat - LCO 101, Column Oven

Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR

Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR

Hmotnostní spektrometr - LCQ Advantage MAY, Finnigan

Kolona – RESTEK ULTRA Aqueous, C18, 5 μ m, 250 x 4,6 mm

Automatická elektroforetická stanice Experion, Bio-Rad (USA)

Experion priming station, Bio-Rad (USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu, Series 90, Mid Range Power Supplies (USA)

Elektrický vařič ETA (ČR)

4.2 Analyzované vzorky piva

Pro analýzu bylo vybráno celkem 10 vzorků nealkoholického piva, z nichž 9 bylo pivo české a 1 vzorek zahraniční. Všechny vzorky byly baleny ve skleněných láhvích.

značka	místo výroby	vlastník	minimální trvanlivost	alkohol [%]
Radegast Birell	Nošovice	SABMiller	14.6.2010	0,49
Stella Artois	Leuven	InBev	4.3.2010	0,50
Litovel Free	Litovel	-	20.3.2010	0,50
Budweiser Budvar	České Budějovice	-	7.7.2010	0,50
Staropramen	Praha-Smíchov	InBev	21.4.2010	0,50
Bernard -S čistou hlavou	Humpolec	-	15.4.2010	0,50
Zlatopramen - Fríí	Krásné Březno	Heineken	26.7.2010	0,49
Starobrno - Fríí	Brno	Heineken	9.6.2010	0,50
Černá Hora - Forman	Černá Hora	-	1.5.2010	0,00
Svijany - Vozka	Svijany	Baas	20.7.2010	0,50

Tabulka 4: Seznam pív, použitých pro analýzu

4.2.1 Zpracování vzorků pro analýzy

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo pivo sonifikováno za účelem odstranění obsaženého oxidu uhličitého. Tato úprava byla provedena i pro vzorky u stanovení technologických charakteristik. Dále bylo pivo ředěno dle požadavků metody.

Pro stanovení proteinů pomocí mikročipové elektroforézy byl vzorek piva lyofilizován.

4.2.2 Stanovení antioxidačních látek

4.2.2.1 Stanovení celkových polyfenolů

K 1 ml Folin – Ciocaltauovu činidlu ředěnému vodou v poměru 1:9 byl přidán 1 ml vody a 50 μ l vzorku piva. Pivo bylo před přidáním sonifikováno po dobu 5 minut. Po promíchání a 5 minutovém stání byl přidán nasycený roztok uhličitanu sodného. Vzorek byl opět promíchán na vortexu a po 15 minutách byla proměřena absorbance při 750 nm. Kalibračním roztokem byla 0,6 M kyselina gallová v koncentracích od 0 – 0,55 mg/ml.

4.2.2.2 Stanovení celkových flavonoidů

Byl připraven 5 % roztok dusitanu sodného, 10 % roztok chloridu hlinitého ve vodě, 1 M roztok hydroxidu sodného. Vzorek byl 5 minut sonifikován. Následně bylo 0,5 μ l čerstvého

vzorku smícháno se 1,5 ml vody a 0,2 ml roztoku NaNO_2 , po promíchání a 5-ti minutovém odstátí bylo přidáno 0,2 ml roztoku Al_2O_3 po promíchání a 5-ti minutovém odstátí bylo přidáno 1,5 ml roztoku NaOH a ihned 1 ml vody. Po 15 minutách byla změřena absorbance při 510 nm. Kalibračním roztokem byl katechin 1 M v rozsahu koncentrací 0 – 0,2 mg/ml.

4.2.2.3 Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí diagnostické soupravy Total Antioxidant Status (TAS, Randox, USA). Analýza byla provedena dle postupu přiloženého k soupravě výrobcem.

Do zúžené kyvety bylo napipetováno 10 μl vzorku a smícháno s 0,5 ml chromogenu. Následně byla proměřena absorbance při vlnové délce 600 nm proti vzduchu. Ke směsi v kyvetě bylo přidáno 100 μl substrátu (peroxidu vodíku) a po uplynutí tří minut byla opět proměřena absorbance. Absorbance byly proměřeny také u standardu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetra-methylchroman-2-karboxylová kyselina) a blanku, vzorek byl nahrazen deionizovanou vodou.

Z rozdílu absorbancí standardu a blanku byl dle návodu výrobce vypočten faktor. Z hodnoty faktoru a rozdílu absorbancí u vzorku byla vypočtena celková antioxidační kapacita.

$$\text{faktor} = \frac{\text{koncentrac e standardu}}{(\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ standard})} \quad (1)$$

$$\text{TAS}(\text{mmol/l}) = \text{faktor} \cdot (\Delta A \text{ blank} - \Delta A \text{ vzorek}) \quad (2)$$

4.2.3 Stanovení pivovarských parametrů a charakteristik [32]

4.2.3.1 Stanovení celkových hořkých látek

Vzorek o objemu 10 ml byl sonifikován (20 minut) a pipetován do centrifugační kyvety. Bylo přidáno 0,5 ml 6 M HCl , 20 ml izooktanu a několik skleněných kuliček. Kyvety byly třepány 15 minut při 20 °C na třepačce a poté odstředovány po dobu 3 minut při frekvenci 3000 ot./min. Absorbance isooktanového extraktu vzorku je měřena proti čistému isooktanu.

$$\text{Jednotky hořkosti} = 5000 \cdot A \quad [\text{JH}] \quad (3)$$

4.2.3.2 Stanovení isosloučenin

Vzorek o objemu 10 ml byl sonikací (20 minut) zbaven oxidu uhličitého. Poté byl přidán 1 ml 3 M HCl a 20 ml izooktanu, směs byla třepána na třepačce. Po uplynutí 5 minut, byla změřena absorbance při 275 nm. Vzorek byl měřen proti čistému isooktanu.

$$\text{Isloučeniny} = 57,2 \cdot A - 5,9 \quad (4)$$

4.2.3.3 Stanovení skutečného a zdánlivého extraktu

Ze vzorku piva bylo odebráno 300 – 500 ml, tento vzorek byl vytemperován na 20 °C a sonifikován (5 min). Přes skládaný filtr bylo pivo přefiltrováno a tak zbaveno pěny. Prvních 50 ml filtrátu bylo vylito. Takto upravené pivo bylo naváženo do destilační baňky, 100 g

vzorku a 50 g vody. Do předvážené předlohy bylo dáno 5 - 10 ml destilované vody. Destilace byla ukončena po destilování 85 – 90 ml (cca 45 minut). Obsah předlohy byl doplněn vodou na 100 g. Relativní hustota destilátu byla stanovena pyknometricky. Zbytek v destilační baňce byl vytemperován na 20 °C a doplněn destilovanou vodou na původní hodnotu. Poté byla stanovena relativní hustota opět pyknometricky. Pyknometrické stanovení relativní hustoty bylo provedeno také u vzorku piva zbaveného oxidu uhličitého a pěny. V pivovarských tabulkách byly vyhledány odpovídající hodnoty hmotnostního zlomku extraktu.

Relativní hustota destilátu, zbytku po destilaci a zdánlivého extraktu byla vypočtena podle vztahu [32]:

$$d_{20/20} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}, \text{ kde} \quad (5)$$

m_1 = hmotnost prázdného pyknometru (g)

m_2 = hmotnost pyknometru s vodou (g)

m_3 = hmotnost pyknometru s destilátem, zbytkem po destilaci nebo vytřepaným pivem (g)

4.2.4 Mikročipová elektroforéza

Kapilární elektroforéza na čipu umožňuje simultánní analýzu více vzorků během několika minut. Výhodou této metody je také minimální objem vzorku. Separace analytu probíhá v kanálcích vyleptaných do mikročipu, poté jsou na čip nanесeny všechny roztoky. Následně probíhá elektroforetická separace vzorků a detekce nejčastěji pomocí laserem indikované fluorescence. Nejčastěji slouží analýza pro vzorky proteinů, DNA a RNA [30].



Obrázek 11: Stanice Experion [31]

4.2.4.1 Experion

První systém pro denaturační čipovou elektroforézu proteinů v přítomnosti SDS (dodecylsírán sodný) popsal Yao a spol. přičemž první komerční zařízení bylo vyvinuto firmou Caliper Technologies v roce 2001 [30]. Experion je automatický systém pro elektroforézu na čipu vyvinutý firmou Bio-Rad. Separace probíhá tzv. „Lab on Chip“ mikrofluidní technologií (Caliper Life Sciences) na malém destičkovém čipu s následnou fluorimetrickou detekcí. Na jednom čipu je možné provést analýzu až 10 proteinových nebo 12 vzorků nukleových kyselin během 30 min. Při analýze proteinů oproti klasické SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS) odpadají časově náročné kroky zahrnující přípravu gelů a detekci proteinů pomocí Coomassie Blue, odbarvování gelů, jejich dehydrataci a dokumentaci. Další výhodou je i automatická relativní i absolutní kvantifikace separovaných biomakromolekul. Při práci s Experionem je nutné mít na paměti určitá omezení, kterými jsou posun molekulových hmotností některých detegovaných proteinů ve srovnání s SDS-PAGE, popř. problematická analýza polypeptidů s molekulovou

hmotností nižší než 10 kDa, která je způsobena emisním maximem použitého fluorescenčního barviva [30].

Analýza bílkovin byla prováděna pomocí experion Pro 260 Analysis Kit, která obsahuje reagenty a mikrofluidní čipy. Dále sada obsahuje proteinový standard Pro260 protein, membránové filtry a jednorázové mikrofluidní čipy.



Obrázek 12: Mikročip [33]

4.2.4.2 Příprava vzorků a roztoků

Z extraktů pív byl odvážen 1 mg vzorku, který byl převeden do roztoku 1 ml neionizované vody. Upravené vzorky pív byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Následně byly vzorky vortexovány a centrifugovány 3 – 5 sekund. Práce se vzorky byla prováděna tak, aby došlo k minimálnímu styku vzorku se světlem.

4.2.4.2.1 Příprava barvicího roztoku, separačního gelu a vzorkového pufru

20 μ l Pro260 stain bylo přidáno k 520 μ l Pro260 gel do zkumavky s gelem. Směs byla vortexována a krátce centrifugována. Gelový roztok byl přefiltrován přes membránový filtr, při 10 000 ot/min po dobu 5 minut. (Takto přefiltrovaný gelový roztok se může používat 4 týdny, potom je třeba jej znova přefiltrovat).

Pro separování za redukčních podmínek se přidává do 30 μ l roztoku vzorkového pufru 1 μ l β -merkaptoethanolu. Za neredukujících podmínek se používá 1 μ l deionizované vody na 30 μ l vzorkového pufru.

4.2.4.2.2 Příprava vzorků a proteinového standardu

Proteinový standard, který je součástí dodávané soupravy, byl připraven smícháním 2 μ l vzorkového pufru a 4 μ l *Pro260 ladder* v mikrozkušavce. Stejně tak byly i ke vzorkům přidávány 2 μ l vzorkového pufru. Směsi byly jemně vortexovány a krátce stočeny. Poté byly všechny vzorky povařeny 3 – 5 minut. Po vychladnutí byly opět krátce centrifugovány. Následně bylo přidáno 84 μ l deionizované vody *ReadyPrep™ proteomic grade water*. Po další centrifugaci byly vzorky připravené k nanášení na čip.

4.2.4.3 Nanášení gelu a vzorku

Na čip, který byl umístěn na nanášecí gelovou stanici, bylo napipetováno do jamky s označením GS 12 μ l gelového roztoku. Mikročip byl uzavřen do nanášecí stanice a při zvoleném tlaku po dobu 1 minuty byl gel polymerován. Poté bylo opět 12 μ l nanášeno do čtyř jamek označených GS, včetně jamky první. Stejný objem gelu byl nanášen i do jamky G.

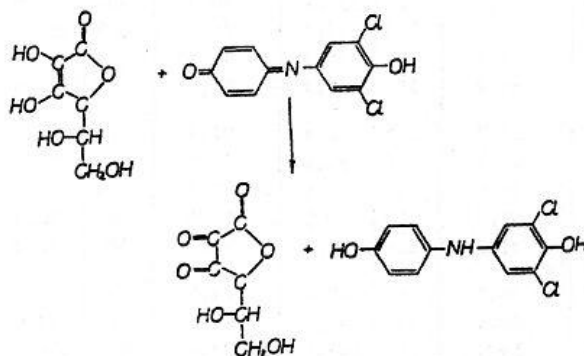
Nakonec bylo nepipetováno 10 vzorku do jamek s označením 1 – 10, vždy po 6 μ l. Vzorky, gel i roztok gelu musí být nanesen tak, aby nedošlo k tvorbě vzduchových bublin. Analýza by pak nemohla být provedena.

4.2.4.4 Vlastní analýza

Připravený čip se vzorky byl vložen na příslušné místo v automatické elektroforetické stanici. Na příslušném počítači byl spuštěn software Experion, v programu byla zvolena nová analýza (New run) a protokol Experion Pro260. Analýza byla spuštěna pomocí tlačítka Start. Ukončení analýzy bylo symbolizováno nápisem Run complete. Po ukončení analýzy je třeba naplnit čistící čip 800 μ l deionizované vody, umístit do elektroforetické stanice a zahájit proces čištění po dobu přibližně 60 sekund.

4.2.5 Stanovení vitamínu C

Analýza byla provedena pomocí titrace, za použití odměrného roztoku 2,6-dichlorindofenolu (0,0005 mol/l). Titrací kyseliny L-askorbové odměrným roztokem 2,6-dichlorindofenolu dochází k oxidaci kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a sám se redukuje na bezbarvou leukobázi.



Obrázek 13

4.2.5.1 Vlastní stanovení

Jako standardní roztok byl použit roztok kyseliny L – askorbové o koncentraci 4 mg/100 ml. Vzorek piva byl sonifikován po dobu 5 minut, u čerstvě otevřeného piva 10 minut. Objem 25 ml vzorku byl odpipetován do odměrné baňky a titrován roztokem 2,6-dichlorindofenolu až do narůžovělého zbarvení (stálého 30 s).

4.2.6 Stanovení polyfenolických látek pomocí LC/PDA/ESI-MS analýzy

Optimalizace analýzy probíhala s využitím směsi dostupných standardních sloučenin flavonoidů (kyselina ferulová, chlorogenová, gallová, katechin, epikatechin, naringenin, morin, rutin), kdy 0,0015 g standardu bylo rozpuštěno v 1,5 ml směsi 1% kyseliny octové a acetonitrilu v poměru 1:1. Roztok byl naředěn na výslednou koncentraci 0,1 mg/ml. Veškerá měření probíhala na HPLC/MS systému od firmy Thermo Finnigan sestávajícím z dvojústové MS pumpy se zabudovaným degaserem, rozpouštědlové platformy, PDA („photo diode array“) detektoru a hmotnostního spektrometru LCQ Advantage Max. Výhodou PDA detektoru je, že umožňuje nejen snímat celé absorpční spektrum zvolenou rychlostí, avšak navíc též odezvu při více konkrétních vlnových délkách samostatně.

4.2.6.1 Optimalizace složení mobilní fáze pro chromatografickou separaci polyfenolů

Jako základní mobilní fáze byla zvolena soustava rozpouštědel acetonitril a 1% kyselina octová ve vodě jakožto vhodná kombinace uváděná pro analýzy látek polyfenolického typu [34, 35]. V první fázi optimalizace byla prováděna isokratická eluce připraveného standardního preparátu (složení mobilní fáze se během separace neměnilo), kdy byly aplikovány různé poměry zmíněných základních rozpouštědel. Ve druhé fázi bylo zkoušeno několik různých programů gradientové eluce (složení mobilní fáze se během separace měnilo) uvedených v odborné literatuře [36], které byly následně modifikovány.

4.2.6.2 Podmínky separace

Separace probíhala na koloně RESTEK (C18 Ultra Aqueous 250 x 4,6 mm). Doba separace byla 53 minut (*tabulka 5*). Vyhodnocení bylo provedeno z MS spektra – odečtem plochy píku vyfiltrovaného dle příslušných $m/z + 1$ (ověřeno dle standardů). Kvantifikovány byly pouze vybrané fenolické látky piva, k nimž byly dostupné standardy - morin, rutin, naringenin, luteonin – flavonoidy a katechiny.

		časový úsek	Mobilní fáze: 1% kyselina octová :ACN
1	Lineární gradient	3 min	60-57 % kys. Octové : 40-43 % ACN
2	Lineární gradient	20 min	57-55 % kys. octové:43-45 % ACN
3	Lineární gradient	10 min	55-45 % kys. octové:45-55 % ACN
4	Izokratický průtok	30 min	45 % kys. octové:55 % ACN

Tabulka 5: Průběh gradientové eluce

4.2.7 Kalibrace a optimalizace (ladění) hmotnostního spektrometru [34]

Za účelem měření s hmotnostní detekcí byl připojen hmotnostní spektrometr LCQ Advantage Max vybavený elektrosprejem (iontový zdroj), iontovou optikou složenou ze tří oktapólů, analyzátozem iontovou pastí a elektronásobičem jako vlastním detektorem. Optimalizace tohoto zařízení zahrnovala kalibraci a tzv. tuning (ladění). Celý systém byl řízen softwarem Xcalibur.

4.2.7.1 Kalibrace a ladění MS detektoru

Kalibrace přístroje byla provedena automaticky zadáním v řídicím systému Xcalibur pomocí výrobcem dodávaných kalibračních roztoků, které představují kofein ($m/z = 195$), (pro kalibraci je používán přímo komerční roztok o koncentraci 1 mg/ml v methanolu), tripeptid L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanin acetát monohydrát (Met-Arg-Phe-Ala neboli MRFA) a proteinový vzorek s komerčním názvem Ultramark ($m/z = 1\ 022, 1\ 122, 1\ 222, 1\ 322, 1\ 422, 1\ 522, 1\ 622, 1\ 722$ a $1\ 822$).

Pro vyladění metody byl postupným ředěním zásobního roztoku reserpinu o koncentraci 1 mg/ml v roztoku methanol:voda (50:50) připraven roztok o koncentraci 1 µg/ml. Tato směs byla do MS detektoru dávkována kontinuálně pomocí integrované syringe pumpy. Ladění (tuning) přístroje probíhala opět po nastavení v programu Xcalibur automaticky. Výsledkem ladění byla metoda (tune file) uložená v softwaru, jenž zahrnovala optimální nastavení parametrů přístroje pro reserpin (*Tabulka 6*). Ladění bylo provedeno v kladném i záporném módu.

Parametr MS	Kladný mód	Záporný mód
Množství sušícího plynu [arb]	20	45
Napětí na kapiláře ESI [kV]	5	4
Teplota na vstupní kapiláře [°C]	250	250
Napětí na vstupní kapiláře [V]	3	-11

Tabulka 6: Ladící parametry pro reserpin v kladném i záporném módu.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Práce se zabývá studiem biologicky aktivních látek v nealkoholických pivech. Ve vzorcích budou analyzovány skupiny charakteristických látek, které jsou vhodné k posouzení pozitivních biologických účinků, ale i pravosti českého piva a jeho odlišení od piv zahraničních. Nejvhodnějšími ukazateli jsou zejména látky fenolické povahy a v menší míře také proteiny. Naměřená data budou porovnána z hlediska obsahu aktivních látek v analyzovaném nealkoholickém pivu a pivu alkoholickém.

5.1 Stanovení aktivních látek v nealkoholickém pivu

5.1.1 Celkové polyfenoly

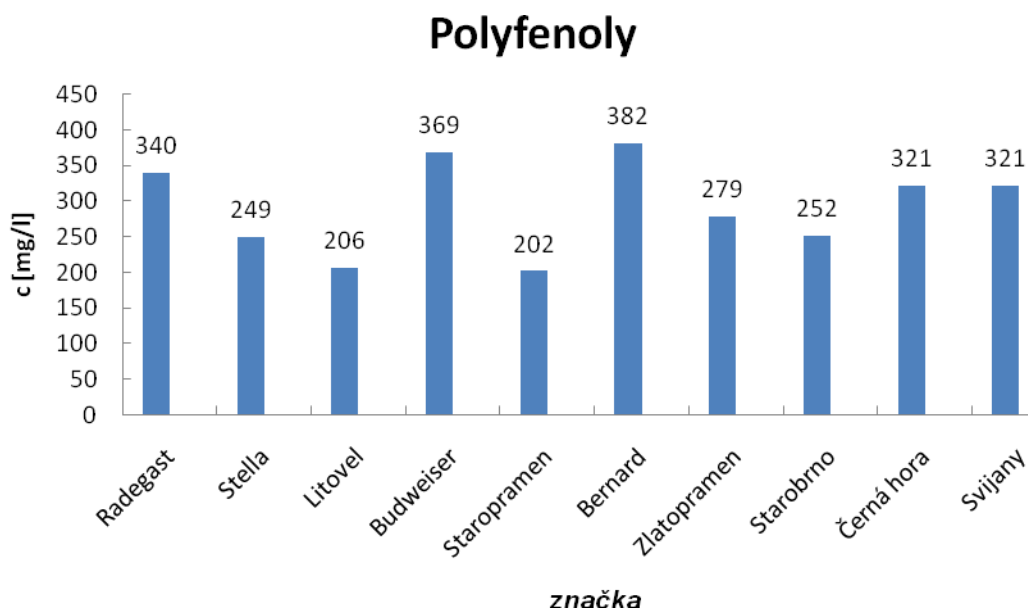
Analýza celkových polyfenolů byla provedena pomocí fotometrické metody za použití Folin – Ciocaltauovým činidla, jak je uvedeno v kapitole 4.2.2.1. Jako standardní roztok byla použita kyselina gallová.

5.1.2 Celkové flavonoidy

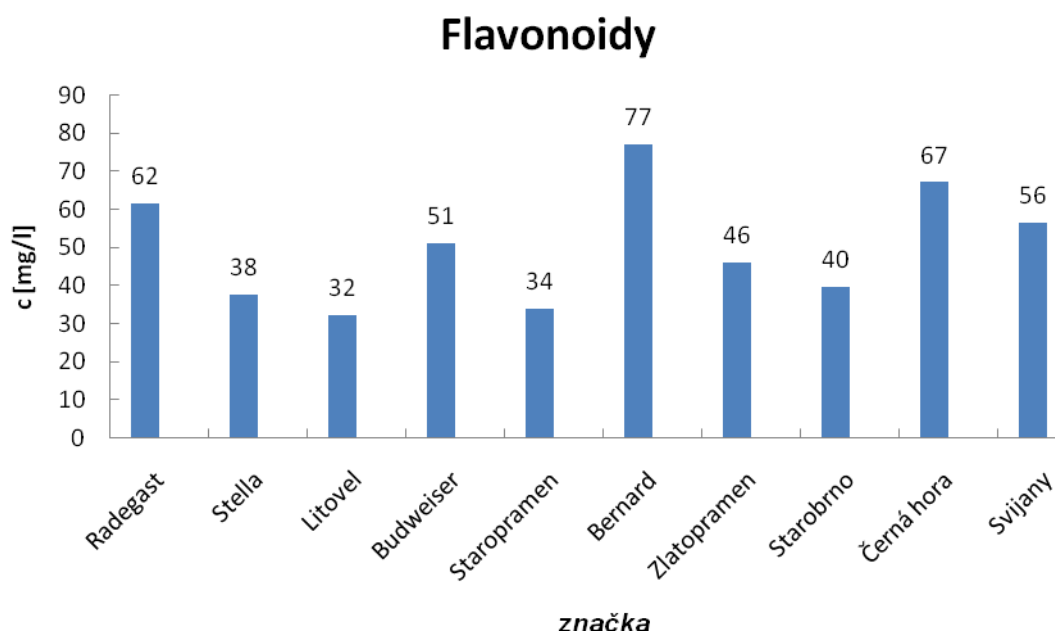
Stanovení celkových flavonoidů ve vzorcích nealkoholických piv bylo uskutečněno pomocí metody popsané v kapitole 4.2.2.2. Metoda je založena na barevné reakci vzorku s hlinitou solí a dusitanem, která je poté lehce změřitelná spektrofotometricky. Standardním roztokem byla roztok katechinu.

n	Vzorek	polyfenoly		flavonoidy	
		c [mg/l]	SD	c [mg/l]	SD
1	Radegast Birell	340,36	0,01	61,58	0,50
2	Stella-Artois	249,07	0,01	37,60	3,27
3	Litovel	205,72	0,01	32,13	1,87
4	Budweiser	368,70	0,01	51,22	2,25
5	Staropramen	201,96	0,01	33,86	4,85
6	Bernard	381,63	0,01	77,21	0,44
7	Zlatopramen-Frší	278,66	0,01	46,04	3,03
8	Starobrno-Frší	251,78	0,01	39,71	1,50
9	Černá Hora-Forman	321,39	0,00	67,14	1,58
10	Svijany-Vozka	320,97	0,00	56,50	1,83

Tabulka 7: Výsledky obsažených fenolických látek v pivu



Graf 1: Obsah celkových polyfenolů ve vzorcích pív



Graf 2: Obsah flavonoidů ve vzorcích pív

Nejvyšší obsah polyfenolů i flavonoidů by nalezen v nealkoholickém pivu Bernard, vysoký obsah byl analyzován též v pivech Radegast, Budweiser, Černá Hora a Svijany. Piva Bernard a Budweiser v alkoholické variantě (12° ležák) byly i v předchozí práci prokázány jako velmi bohaté na fenolické látky [37].

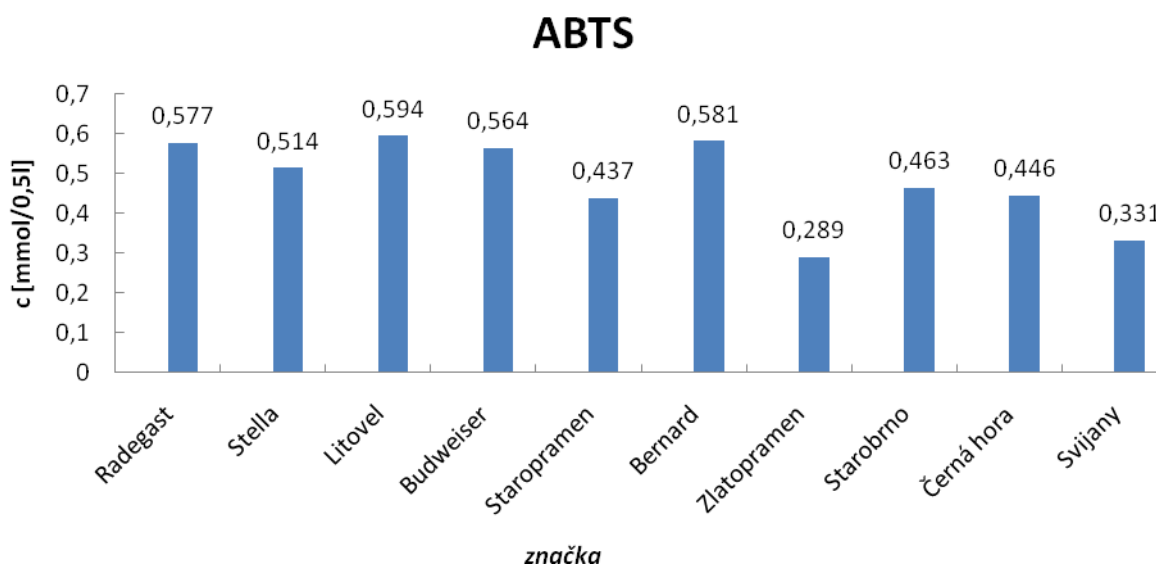
5.1.3 Antioxidační aktivita

Metoda byla založena na reakci barevného radikálu 1,1-diphenyl-2-pikryl-hydrazylu, který je v etanolovém roztoku v barevné radikálové formě. Jeho redukce se projevila odbarvením roztoku, které bylo měřeno spektrofotometricky při 525 nm, druhá testovaná využívala

zhášení radikálového kationtu ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát), jenž byl připraven reakcí ABTS diamonné soli s peroxodisíranem v poměru 2:1 za vzniku modrozeleného roztoku, jehož odbarvení vlivem antioxidantů bylo měřeno při 600 nm. Úbytek absorbance byl úměrný antioxidační aktivitě (kapitola 4.2.2.3).

ABTS	
značka	c [mmol/0,5l]
Radegast	0,577
Stella	0,514
Litovel	0,594
Budweiser	0,564
Staropramen	0,437
Bernard	0,581
Zlatopramen	0,289
Starobrno	0,463
Černá hora	0,446
Svijany	0,331

Tabulka 8: Výsledky celkové antioxidační aktivity



Graf 3: Celková antioxidační aktivita

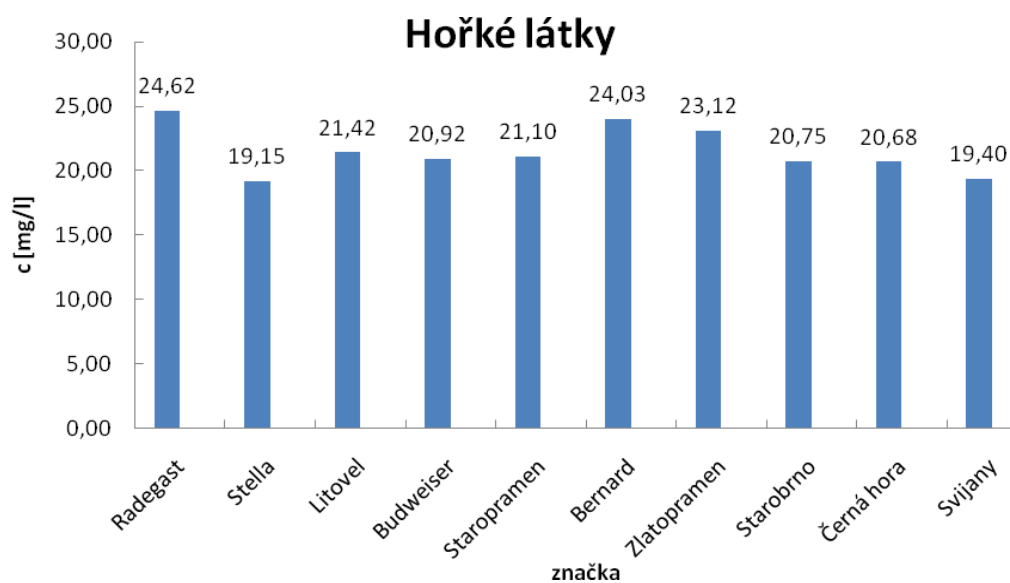
Metoda DPPH se při analýze antioxidační aktivity neosvědčila z důvodu interference zbarvení radikálu a vzorků. Vysoké hladiny ABTS byly nalezeny v pivech Litovel, Bernard, vysoký obsah byl analyzován též v pivech Radegast Birell a Budweiser.

5.1.4 Hořké látky

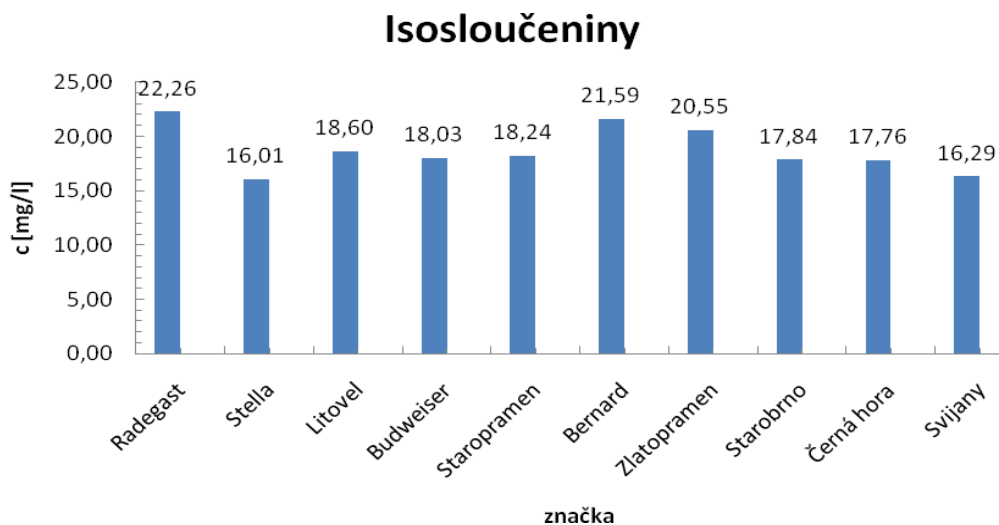
Příprava a průběh stanovení hořkých látek je uvedena v kapitole 4.2.3.1. V analyzovaném isooktanovaném extraktu byly stanoveny celkové jednotky hořkosti ECB, kdy 1 jednotka ECB odpovídá přibližně 1 mg hořkých látek nacházejících se v 1 litru piva. Dále je v tabulce uvedeno procentuální zastoupení isosloučenin v jednotlivých vzorcích.

n	vzorek	hořké látky		isosloučeniny		
		c [mg/l]	SD	c [mg/l]	SD	[%]
1	Radegast	24,62	2,89	22,26	0,03	90,43
2	Stella	19,15	0,00	16,01	0,00	83,59
3	Litovel	21,42	10,41	18,60	0,12	86,85
4	Budweiser	20,92	2,89	18,03	0,03	86,19
5	Staropramen	21,10	0,00	18,24	0,00	86,44
6	Bernard	24,03	2,89	21,59	0,03	89,85
7	Zlatopramen	23,12	2,89	20,55	0,03	88,88
8	Starobrno	20,75	0,00	17,84	0,00	85,97
9	Černá hora	20,68	2,89	17,76	0,03	85,87
10	Svijany	19,40	0,00	16,29	0,00	83,99

Tabulka 9: Výsledky koncentrací hořkých látek a isosloučenin v nealkoholických pivech



Graf 4: Obsah hořkých látek ve vzorcích pív



Graf 5: Obsah isosloučenin ve vzorcích pív

Analýzou bylo zjištěno, že nejvíce hořkých látek obsahuje pivo značky Radegast Birrel – 25 EBC. Vysoký obsah hořkých látek se nacházel také v pivu Bernard (24 EBC) a Zlatopramen (23 EBC). Naopak nejnižší koncentrace hořkých látek byla stanovena v pivu Stella Artois a Svijany (19 EBC). Podobné výsledky byly získány i při analýze azosloučenin. Grafické znázornění výsledků analýzy je uvedeno v grafech (*Graf 4*, *Graf 5*). Získané výsledky obsahu hořkých látek v nealkoholických pivech poměrně dobře odpovídají hladinám nalezeným v alkoholických pivech stejné značky či stejného výrobce [37].

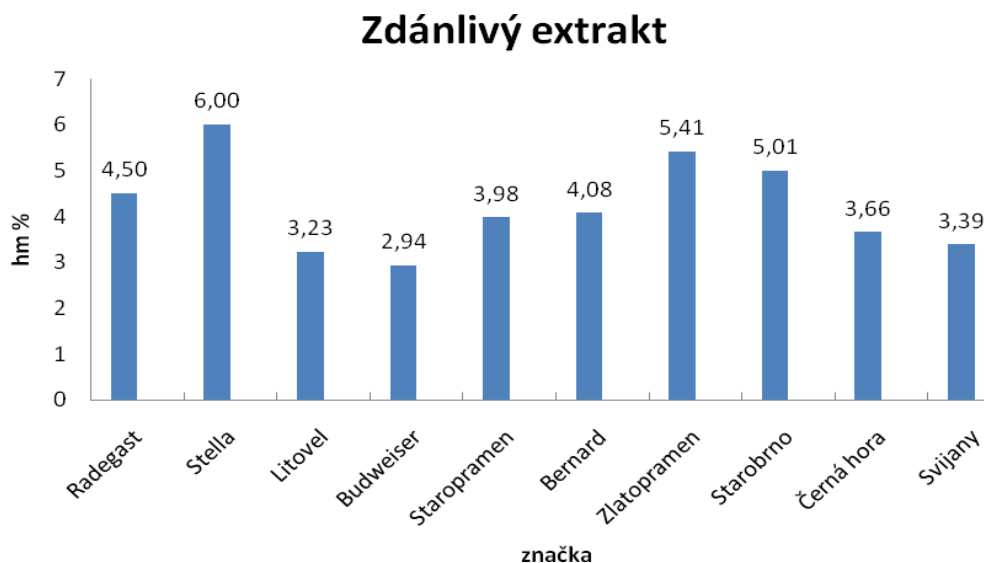
5.1.5 Skutečný a zdánlivý extrakt

Hodnoty skutečného a zdánlivého extraktu jsou ukazatele pivovarských parametrů piva. Mezi tyto parametry řadíme také hodnoty stupňovitosti, skutečného a zdánlivého prokvašení, stupňovitost a obsah alkoholu. U nealkoholických piv, ale nemůžeme tyto charakteristiky vyhodnotit, díky nízké hodnotě obsaženého alkoholu. Ve skutečném extraktu jsou obsaženy všechny extraktivní látky, které jsou v pivu obsaženy. Zdánlivý extrakt piva je extrakt, sloužící pro výpočet extraktu skutečného.

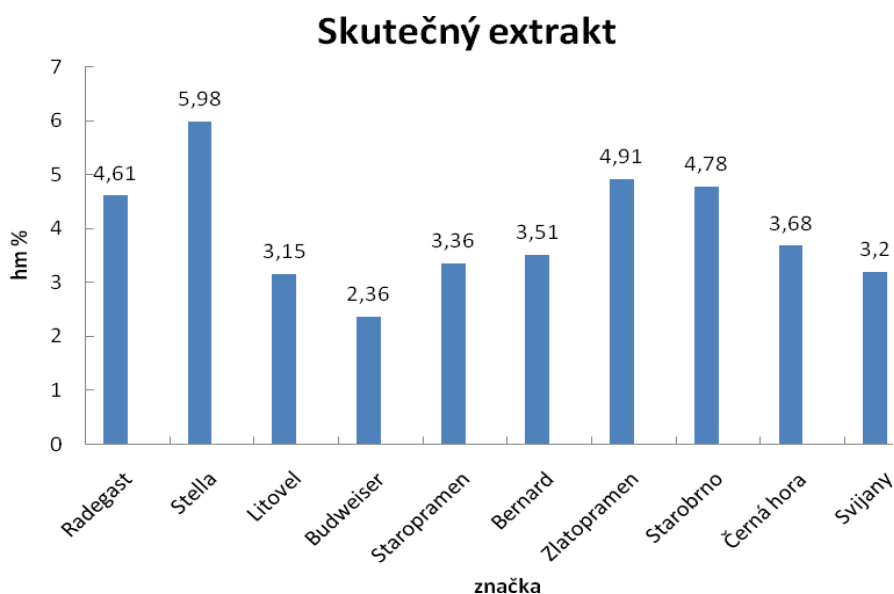
Podrobný popis analýzy a postup vyhodnocení je uveden v kapitole 4.2.3.3.

n	Vzorek	extrakt [hm. %]	
		Skutečný	Zdánlivý
1	Radegast	4,61	4,50
2	Stella	5,98	6,00
3	Litovel	3,15	3,23
4	Budweiser	2,36	2,94
5	Staropramen	3,36	3,98
6	Bernard	3,51	4,08
7	Zlatopramen	4,91	5,41
8	Starobrno	4,78	5,01
9	Černá hora	3,68	3,66
10	Svijany	3,20	3,39

Tabulka 10: Obsahy skutečného a zdánlivého extraktu



Graf 6: Obsah zdánlivého extraktu



Graf 7: Obsah skutečného extraktu

Nejvyšší hodnotu skutečného extraktu mělo překvapivě nealkoholické belgické pivo značky Stella Artois – 5,98 hm. %. Z piv českých mělo nejvyšší hodnotu skutečného extraktu pivo Zlatopramen – 4,91 hm. %. Hodnota extraktu ve vzorcích u nealkoholických piv je závislá na technologickém postupu výroby. Nejnižší hodnota skutečného extraktu je u piva značky Budweiser – 2,36 hm. %.

5.2 Stanovení proteinů mikročipovou elektroforézou

Celkové proteinové složení analyzovaných nealkoholických piv bylo provedeno pomocí mikročipové elektroforézy (kap. 4.2.4).

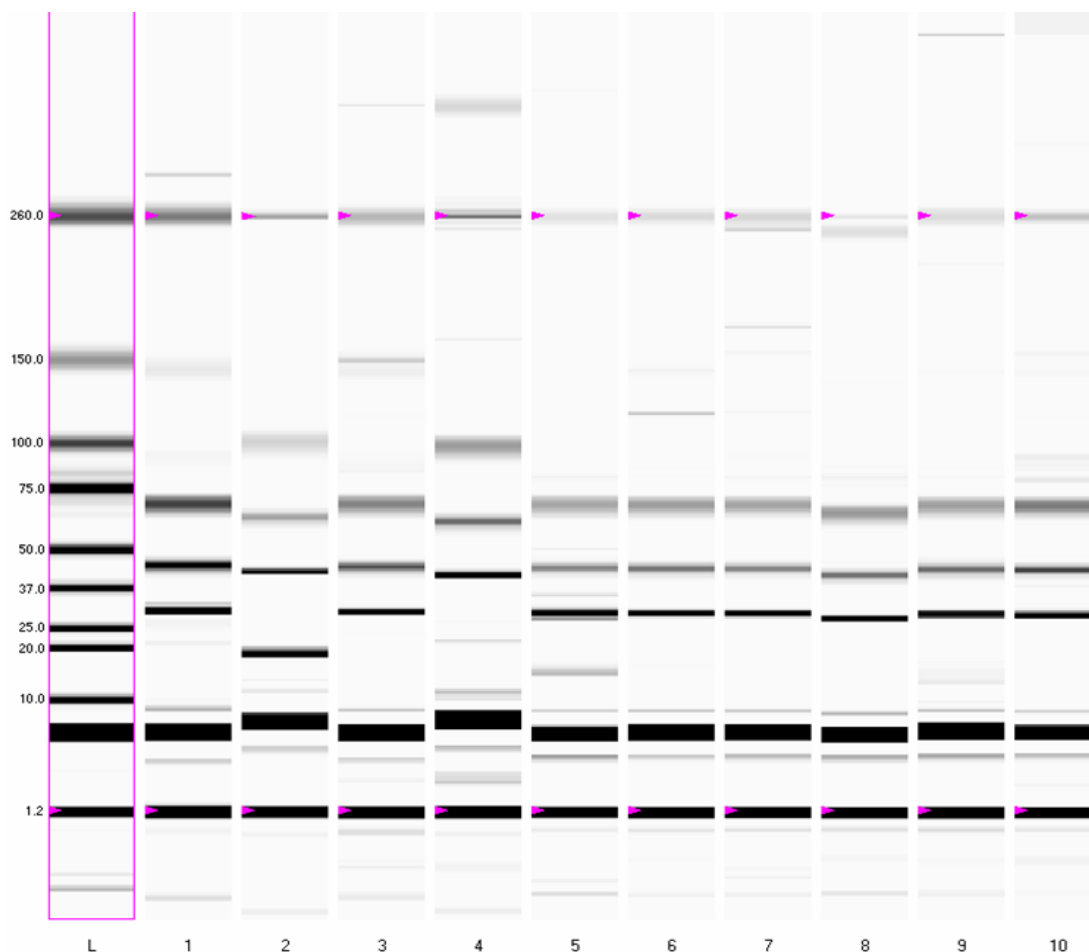
Z uvedených výsledků elektroforézy je patrné, že ve vzorcích se nacházely majoritní proteinové frakce. První velká skupina je patrná na úrovni cca 10 kDa. Další skupinu proteinů lze pozorovat v rozmezí 30-35 kDa a 45 kDa. Poslední viditelnou frakcí jsou proteiny s molekulovou hmotností kolem 70 kDa.

Ve vzorcích piva by měly být nalezeny charakteristické skupiny proteinů. První velká skupina je tvořena serpiny, zejména proteinem Z, jež obsahuje několik proteinů s kyselým pI a molekulovou hmotností kolem 40 kDa. Tato frakce byla prokázána ve všech analyzovaných vzorcích s Mr cca 45 kDa. Další skupinou jsou α -amylázové inhibitory/trypsin o hmotnostním rozsahu 15–19 kDa; této frakci pravděpodobně odpovídá pás odpovídající Mr cca 25 kDa nalezený ve většině piv. Další významnou bílkovinou identifikovanou ve vzorcích piva je LTP. In vivo funkce ječného LTP není známa. Původně bylo uvažováno, že se jedná o inhibitor α -amylázy nebo proteáz. Po uvaření piva je ječný LTP1 obsažen zejména v pивní pěně, kde přispívá k tvorbě a stabilitě pěny. Molekulová hmotnost LTP1 se pohybuje v rozsahu 10 – 14 kDa; tomuto proteinu zřejmě odpovídá majoritní frakce kolem 10 kDa prokázána ve všech vzorcích.

Vzorky									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Staropramen	Starobrno	Zlatopramen	Stella	Černá Hora	Radegast	Svijany	Budvar	Bernard	Litovel

Tabulka 11: Popis vzorků na čipu

L – proteinový standard



Obrázek 14: Mikročipová separace vzorků piva

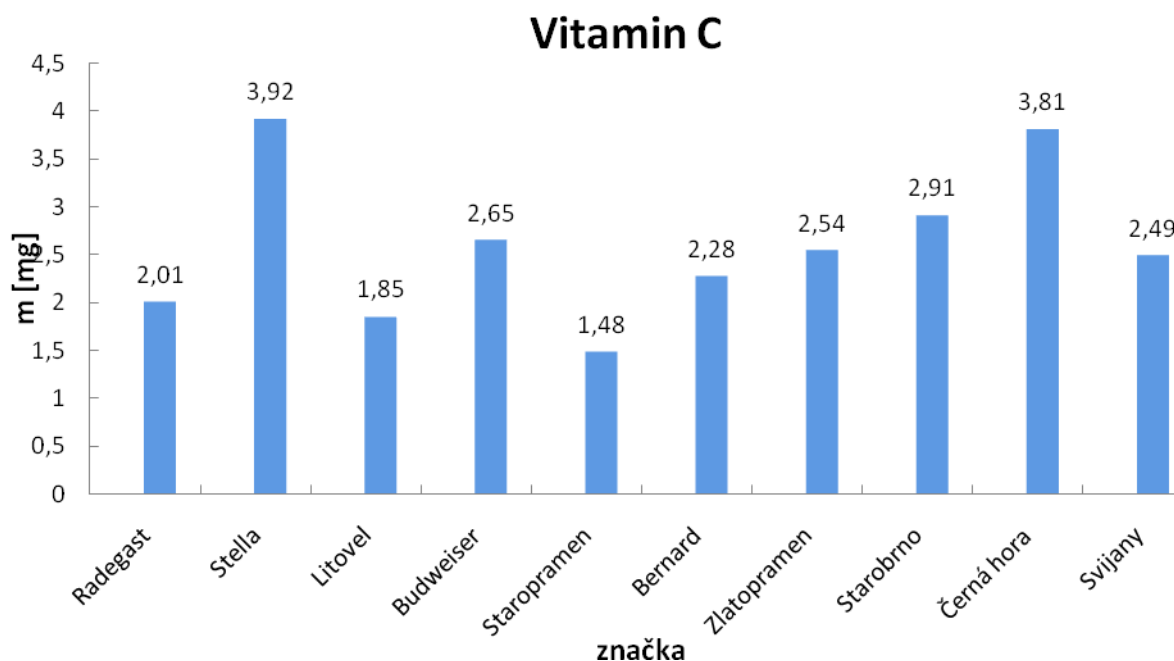
Významnými proteiny jsou B a D hordeiny. Hordeiny jsou řazeny mezi prolaminy, hlavní skupinu obilných zásobních proteinů nacházejících se v zrna. Hordeinové frakce nacházející se v pive iniciují tvorbu zákalu. Tyto proteiny představují vysokomolekulární frakci s M_r cca 70 kDa. Přestože pozice hlavních proteinových frakcí na mikročipu jsou poněkud zkreslené, sestava majoritních pásů bílkovin nalezených u nealkoholických piv odpovídá typickému složení proteinů nalezenému v pivech alkoholických [37].

5.3 Stanovení vitamínu C

Vitamin C byl v analyzovaných vzorcích nealkoholických piv stanovován postupem uvedeným v kapitole 4.2.5.

n	vzorek	m [mg]	SD
1	Radegast	2,01	0,09
2	Stella	3,92	0,09
3	Litovel	1,85	0,09
4	Budweiser	2,65	0,09
5	Staropramen	1,48	0,09
6	Bernard	2,28	0,09
7	Zlatopramen	2,54	0,00
8	Starobrno	2,91	0,09
9	Černá hora	3,81	0,16
10	Svijany	2,49	0,09

Tabulka 12: Množství vitamínu C v 0,5 l piva



Graf 8: Obsah vitamínu C v 0,5 l piva

Analýza potvrdila, že v pivu není obsaženo významné množství vitamínu C. Nejvíce vitamínu C bylo zaznamenáno u zahraničního piva Stella Artois a českého piva Černá Hora, nejméně pak u Staropramenu.

5.4 Chromatografické separace flavonoidních sloučenin piva

5.4.1 Optimalizace poměru rozpouštědel v mobilní fázi

Při optimalizaci separace jednotlivých látek bylo na chromatografickou kolonu aplikováno několik kombinací mobilních fází obsahujících kombinaci ACN + 1% vodný roztok kyseliny octové v různých poměrech za isokratických i gradientových podmínek. Jako nejlepší byl

vybrán gradient o pH 4. Zvolené nastavení gradientové eluce směsi standardů pak umožnilo postupnou separaci polyfenolických sloučenin v reálných vzorcích.

Na vstupu A gradientového čerpadla byla dávkována 1% kyselina octová, na vstupu D byl dávkován acetonitril. Eluce probíhala na koloně Restek C18 Ultra Aqueous při průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min. Absorpční maximum všech analyzovaných standardních látek bylo při 280 nm.

		časový úsek	Mobilní fáze: 1% kyselina octová :ACN
1	Lineární gradient	3 min	60-57 % kys. Octové : 40-43 % ACN
2	Lineární gradient	20 min	57-55 % kys. octové:43-45 % ACN
3	Lineární gradient	10 min	55-45 % kys. octové:45-55 % ACN
4	Izokratický průtok	30 min	45 % kys. octové:55 % ACN

Tabulka 13: Průběh gradientové eluce

5.4.2 Optimalizace izolace polyfenolických látek z piva

Nejllepší odezva detekovaných látek byla zaznamenána po extrakci ethylacetátem, kdy došlo především k odstranění nežádoucích příměsí. Výjimku tvořily pouze látky ze skupiny katechinů (epikatechin, katechin, epikatechingallát, pigalokatechin, epigallokatechin gallát, katechin gallát), jež byly nejlépe separovány přímo ve vodné fázi po aplikaci mikrofiltrace, proto byla ve všech později prováděných analýzách a u všech zkoumaných vzorků využívána jak ethylacetátová extrakce (pro flavonoidy), tak i mikrofiltrace (pro katechiny).

5.5 Optimalizace parametrů MS detekce

Nejprve byla provedena kalibrace hmotnostního detektoru dle pokynů výrobce, a to pomocí standardních roztoků kofeinu, MRFA a směsi Ultramark.

Kalibrace samotná k získání uspokojivých výsledků nestačí. Je nutné nastavit parametry analýzy tak, aby co nejvíce vyhovovaly struktuře sloučenin dané skupiny stanovovaných látek a aby odezva i citlivost přístroje při snímání hmotnostního spektra byla co nejvyšší. Postupným laděním detektoru na určitý analyt dochází k nastavení optimálních hodnot parametrů přístroje.

Před laděním na požadovaný analyt je vhodné provést ladění pomocí výrobcem dodávaného standardu reserpinu. Výrobce garantuje, že po naladění přístroje na reserpin jsou parametry detektoru nastaveny tak, aby bylo možné s určitou sníženou citlivostí stanovit většinu sloučenin detekovatelných daným typem ionizace.

Pro analýzu polyfenolických látek byl přístroj doladěn na standardní látku epikatechin, který poskytoval nejlepší odezvu při chromatografické separaci při podmínkách uvedených v Tabulce 14.

parametr	kladný mód	záporný mód
množství sušícího plynu (arb)	40	45
napětí na kapiláře ESI (kV)	5	4
napětí na vstupní kapiláře (V)	40	-6
teplota na vstupní kapiláře (°C)	250	250

Tabulka 14: Ladící parametry pro epikatechin v kladném i záporném módu

5.5.1 Kvantifikace fenolických látek

U dostatečně čistých standardních sloučenin byly zjištěny příslušné retenční časy a byla změřena jejich závislost plochy píku v MS spektru na koncentraci v roztoku mobilní fáze (*Tabulka 15*). Hodnoty byly zpracovány do grafické závislosti, na základě regresní analýzy byly vypočteny koncentrace přítomných antioxidantů v jednotlivých vzorcích

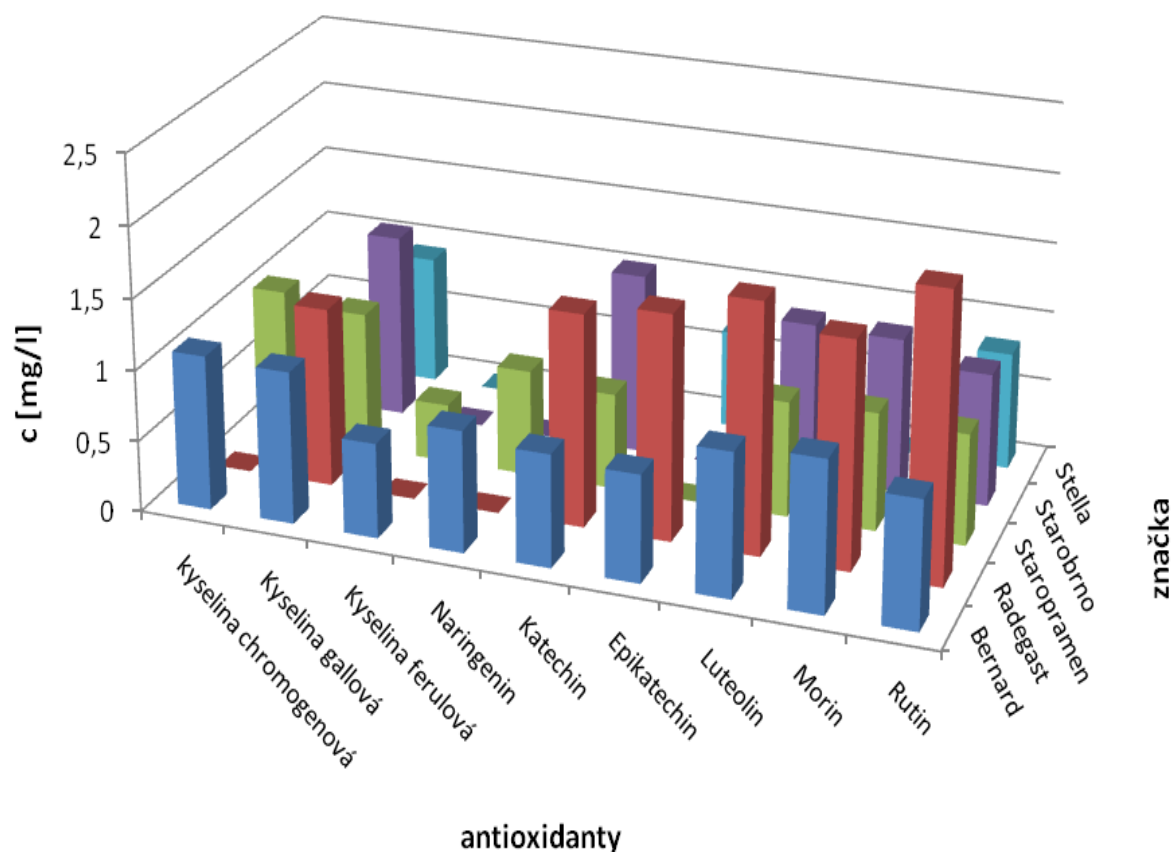
Kvantitativní analýza individuálních flavonoidů byla z časových důvodů provedena jen u 5 vybraných vzorků nealkoholických piv. Výsledky stanovení jsou uvedeny v *Tabulka 16* a v souhrnném grafu *Graf 9*. Příslušná hmotnostní spektra použitá k vyhodnocení výsledků jsou uvedena v *Příloze 3*.

Standard	c [µg/ml]	rovnice regrese
kyselina chlorogenová	2 - 20	$y = 13939x + 22735$
kyselina gallová	1 - 10	$y = 15156x - 1300,7$
kyselina felurová	2 - 20	$y = 15390x$
naringenin	1 - 10	$y = 4\,000\,000x$
katechin	0,1 - 1,5	$y = 170986x + 326589$
epikatechin	0,15 - 2,5	$y = 233858x + 218928$
luteolin	2 - 10	$y = 221\,120x + 297416$
morin	1 - 10	$y = 149398x$
rutin	1 - 10	$y = 4000000x + 179787$

Tabulka 15: Dostupné flavonoidní standardní látky, rozsah koncentrací kalibračních křivek a regresní rovnice

obsah [mg/l]									
značka	kyselina chlorogenová	kyselina gallová	kyselina felurová	Naringenin	Katechin	Epikatechin	Luteolin	Morin	Rutin
Bernard	1,09 ±0,032	1,071 ±0,114	0,666 ±0,049	0,854 ±0,091	0,791 ±0,036	0,752 ±0,072	1,006 ±0,099	1,058 ±0,141	0,893 ±0,028
Radegast	-	1,262 ±0,143	-	-	1,496 ±0,114	1,586 ±0,057	1,763 ±0,096	1,595 ±0,06	2,017 ±0,048
Staropramen	1,06 ±0,089	0,983 ±0,218	0,412 ±0,038	0,751 ±0,236	0,678 ±0,015	-	0,814 ±0,058	0,833 ±0,069	0,782 ±0,15
Starobrno	-	1,31 ±0,028	-	-	1,283 ±0,116	-	1,108 ±0,065	1,094 ±0,123	0,937 ±0,089
Stella	-	0,92 ±0,139	-	-	0,508 ±0,175	0,696 ±0,182	0,744 ±0,105	-	0,83 ±0,033

Tabulka 16: Přehled obsahu polyfenolických látek v nealkoholických pivech



Graf 9: Souhrnný graf obsahu polyfenolů v nealkoholických pivech

5.5.1.1 Majoritní flavonoidy

Fenolickou látkou vyskytující se v analyzovaných vzorcích ve vysokých koncentracích je kyselina chlorogenová – obecně velmi rozšířený flavonoid. Tento flavonoid byl však detekován pouze u dvou vzorků nealkoholických piv (Bernard, Staropramen – *Tabulka 16, Graf 9*).

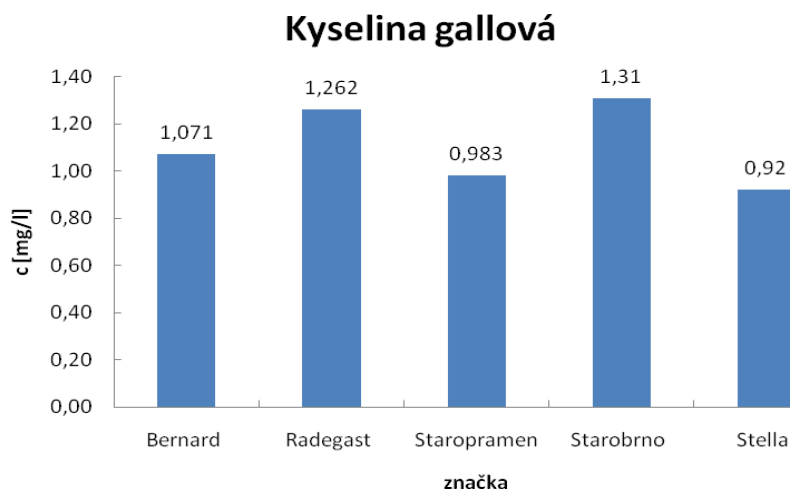
Kyselina gallová je prekurzor taninů a poskytuje při reakci se železnatými solemi tzv. duběnkový inkoust. Kyselina gallová byla detekována u všech vzorků piv, nejvyšší koncentrace byla analyzována v pivu Radegast-Birell. Nejnižší obsah kyseliny gallové byl zaznamenán u zahraničního piva Stella Artois.

Třetí analyzovanou fenolickou kyselinou je kyselina ferulová identifikovaná ve dvou druzích piva - Bernard a Staropramen. Obsah kyseliny ferulové není tak vysoký jako u předchozích dvou kyselin.

Výskyt významného fytoestrogenu naringeninu byl potvrzen ve značkách Bernard a Staropramen. Koncentrace zde byly jen o málo vyšší než u kyseliny ferulové.

Většina polyfenolů v pivu má svůj původ ze sladu. Analýza uvedených čtyř významných antioxidantů dokazuje, že také nealkoholická piva obsahují významné množství fenolických látek prospěšných pro zdraví jedince. Z výsledků uvedených v *Tabulka 15* je patrné, že u značek Bernard a Staropramen byla zaznamenána přítomnost všech analyzovaných fenolických kyselin.

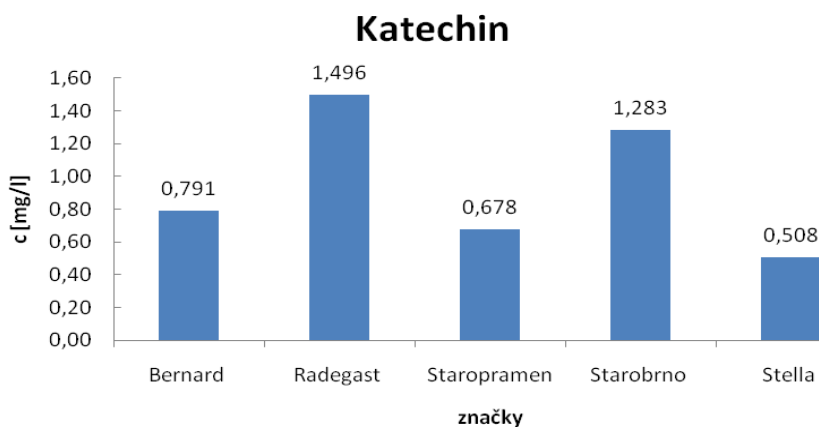
Ve srovnání s výsledky koncentrací těchto majoritních flavonoidů s pivy alkoholickými, můžeme říct, že většina flavonoidů se v nealkoholických pivech vyskytuje ve srovnatelných koncentracích. U kyseliny chlorogenové je koncentrace viditelně nižší než u piv alkoholických [37].



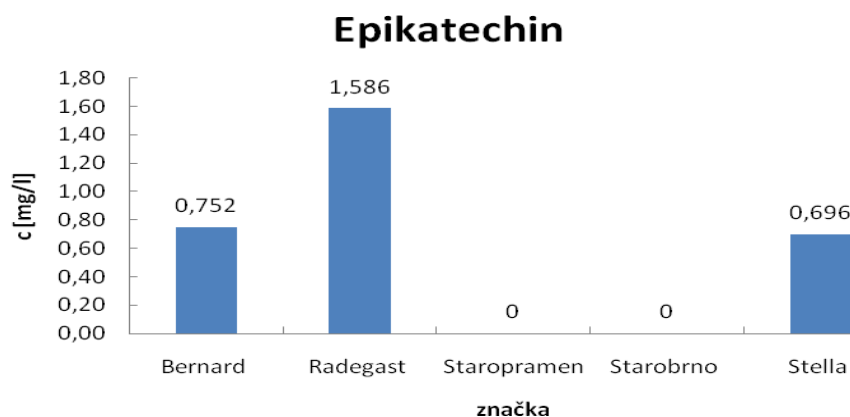
Graf 10: Výsledky stanovení koncentrace kyseliny gallové u vybraných piv

5.5.1.2 Katechiny

Identifikace katechinu proběhla ve všech pěti analyzovaných pivech. Největší zastoupení katechinu bylo u piva Radegast-Birrel (1,496 mg/l). Nejnižší obsah byl zaznamenán u piva Stella Artois (0,508). Analýza katechinů prokázala, že zejména pivo Radegast obsahuje významné množství. Koncentrace u piv alkoholických byla vesměs nižší než u piv nealkoholických.



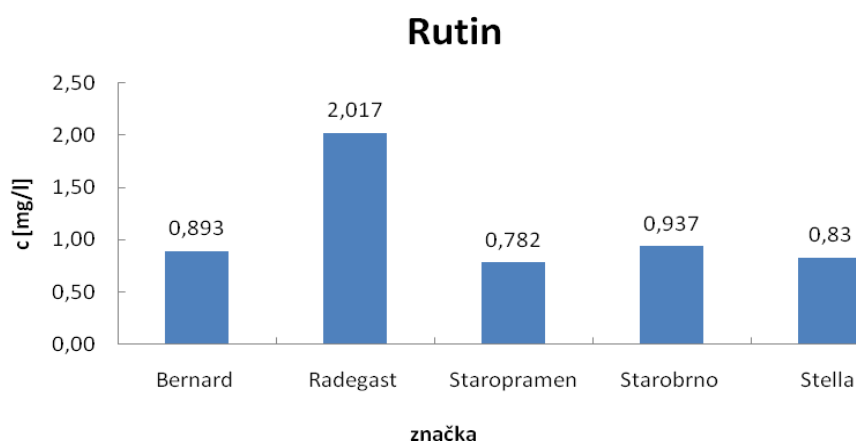
Graf 11: Výsledky stanovení koncentrace katechinu u vybraných piv



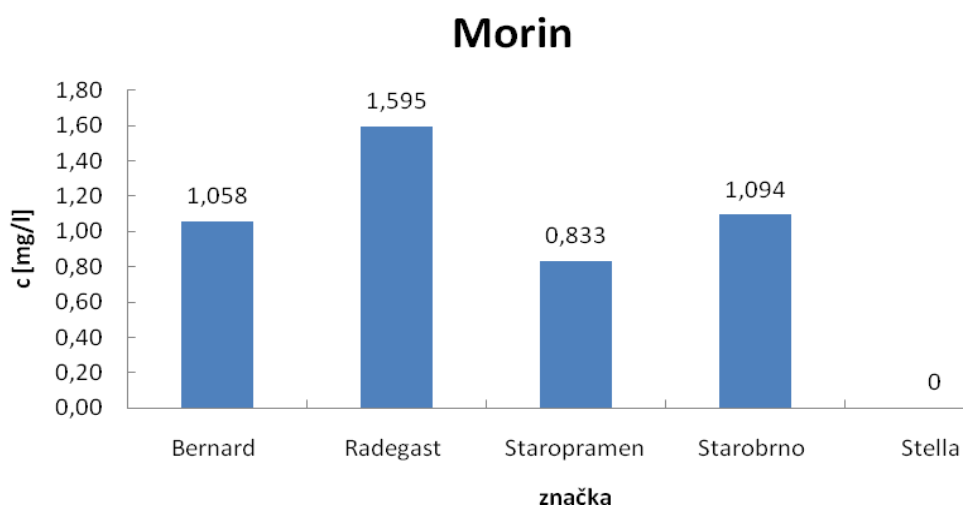
Graf 12: Výsledky stanovení koncentrace epikatechinu u vybraných piv

5.5.1.3 Další analyzované flavonoidy

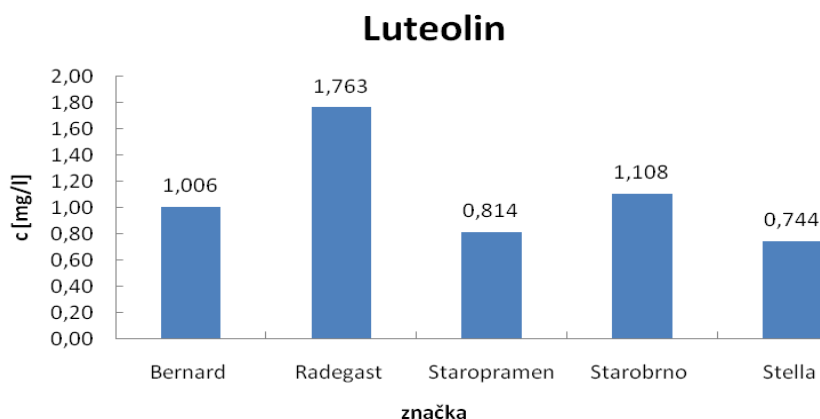
Jedním z největších zdrojů rutinu je pohanka, červené hrozny a citrusové plody [12]. Dle výsledků analýzy do této skupiny můžeme jistě zařadit i nealkoholické pivo, a to především pivo značky Radegast s obsahem (2,017 mg/l). Nejnižší koncentraci rutinu je v pivu Staropramen (0,78 mg/l).



Graf 13: Výsledky stanovení koncentrace rutinu u vybraných piv



Graf 14: Výsledky stanovení koncentrace morinu u vybraných piv



Graf 15: Výsledky stanovení koncentrace luteolinu u vybraných piv

Morin je významným zástupcem flavonových barviv. Největší koncentrace byla identifikována opět u piva Radegast (1,595 mg/l). Ve vzorku piva Stella Artois toto barvivo nebylo identifikováno vůbec. Nejmenší množství bylo zjištěno v pivě Starobrno (0,833).

Dalšími analyzovanými flavonoidy, k nimž jsou k dispozici standardy, patří luteolin, dále pak kaemferol a kverecin. U nealkoholických piv byl z těchto látek detekován pouze luteolin. Opět největší zastoupení bylo pozorováno u piva Radegast. Nejnižší koncentrace byla zjištěna u piva Stella Artois. Luteolin byl stanoven ve všech pěti analyzovaných vzorcích. Výskyt morinu a rutinu v nealkoholickém pivu je až dvojnásobně vyšší než u piv alkoholických, také koncentrace luteolinu je vyšší u nealkoholických piv.

Obsah většiny individuálních flavonoidů odpovídal obsahu celkových flavonoidů a polyfenolů, tedy v pivech s vyšším obsahem skupinových parametrů byly nalezeny i vysoké hodnoty koncentrace individuálních zástupců. Přestože koncentrace jednotlivých látek jsou obvykle o 1-2 řády nižší než skupinové parametry, lze říci, že analyzované majoritní flavonoidy s obsahem v řádu mg/l v součtu (až cca 10 mg/ml – Radegast Birell) významně přispívají k hodnotě celkových flavonoidů (desítky mg/ml).

6 ZÁVĚRY

- Práce byla zaměřena na analýzu biologicky aktivních látek - především látek fenolické povahy a proteinů ve skupině nealkoholických piv a srovnání obsah těchto látek s pivy alkoholickými. Dále také byly analyzovány charakteristické skupinové parametry a technologické charakteristiky - hořké látky, izosloučeniny, skutečný a zdánlivý extrakt.
- Teoretická část je zaměřena na uvedení do historie pivovarnictví v České republice, technologických postupů, jak u piv alkoholických tak nealkoholických. Dále je tato část zaměřena na specifika českého piva a přehled surovin, které se podílí na jedinečnosti českého piva. Součástí teoretického přehledu je popis biologicky aktivních látek, které byly analyzovány a zároveň jsou látkami charakterizujícími české pivo.
- V experimentální části je popsána především optimalizace metod, kterými byly stanovované látky analyzovány. Polyfenoly, flavonoidy, celková antioxidační aktivita a pivovarské charakteristiky byly stanoveny spektrofotometricky. Obsah vitamínu C byl zjištěn titračně. K posouzení obsahu a zastoupení látek fenolické povahy byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-ESI-MS). Sestava proteinů byla stanovována pomocí mikročipové elektroforézy.
- Nejvyšší hodnoty celkových polyfenolů byly znamenány v pivech Radegast-Birell a Bernard. Hladiny byly dokonce u nealkoholických piv větší než u piv alkoholických. Obsah celkových flavonoidů byl zde naopak nižší. Výsledné koncentrace hořkých látek a isosloučenin byly srovnatelné s obsahy v alkoholických pivech. Nejvyšší obsah byl prokázán opět u piv Radegast-Birrel a Bernard. Hodnota skutečného a zdánlivého extraktu byla nejvyšší u zahraničního piva Stella-Artois a dále u českého piva Bernard. Nejvyšší obsah vitamínu C byl nalezen u belgického piva Stella-Artois a české Černé Hory. Celková antioxidační aktivita byla u většiny nealkoholických piv vyšší než u piv alkoholických. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna u piva Litovel, dále pak byly srovnatelné koncentrace zjištěny také u piv Bernard, Radegast-Birell a Budweiser.
- Stanovení proteinů ve vzorcích piva bylo provedeno pomocí mikrofluidního elektroforetického systému Experion (BioRad). Získané výsledky odpovídají vcelku hlavním proteinovým frakcím vyskytujícím se i v alkoholických pivech – protein Z, LTP protein, inhibitory amyláz a frakce hordeinů.
- Další část zahrnovala měření fenolických látek s využitím LC/MS techniky v pěti vybraných druzích nealkoholického piva. Celkem bylo kvantitativně stanoveno devět typů fenolických látek. Nejvíce zastoupená byla kyselina gallová, která byla identifikována ve všech vzorcích. Nejméně zastoupeným derivátem byla kyselina ferulová. Nejvyšší obsah individuálních fenolických látek byl analyzován v pivu Radegast-Birell, kde kromě kyseliny chlorogenové, ferulové a naringeninů byly všechny ostatní látky přítomny v koncentracích kolem 1,5 mg/l. V nealkoholickém

pivu Bernard byly identifikovány a kvantifikovány všechny stanovované individuální polyfenoly. Vysoké hodnoty byly zaznamenány také u nealkoholického piva značky Starobrno. Zastoupení individuálních fenolických látek v nealkoholických pivech je srovnatelné s koncentracemi nalezenými u alkoholických piv.

- Obsahy analyzovaných látek v nealkoholických pivech jsou z největší části ovlivněny technologií výroby. Zatímco technologie výroby piva alkoholického je již po mnoho desítek let dobře známá, u výroby jednotlivých nealkoholických piv lze často jen odhadovat, jakou metodou bylo pivo vyrobeno. Z výsledků analyzovaných vzorků je patrné, že nejvíce biologicky aktivních látek typických pro české pivo obsahuje pivo Radegast-Birell a Bernard. U piva Bernard jsou zjištěné hodnoty pravděpodobně zapříčiněny tím, že k pasterizaci není používán ohřev, nýbrž mikrofiltrace, která je k pivu šetrná. České nealkoholické pivo Radegast-Birell je vyráběno pomocí speciálních kvasinek, které produkují minimum alkoholu. Pokud pivo nemusí být tepelně zpracováno, má šetrný způsob výroby pravděpodobně velký vliv na jeho finální kvalitu.

7 LITERATURA

- [1] PEŠTA, Jiří. *Když se v Milevsku vařilo pivo*. Milevsko : Milevské muzeum, 2008. 257 s. ISBN 978-80-254-1241-1.
- [2] ŽATKULIAK, Alois. *iHNed.cz* [online]. 2009-07-04 [cit. 2010-03-20]. Ekonomika. Dostupné z WWW: <<http://ekonomika.ihned.cz/c1-36652790-ochranna-znamka-ceske-pivo-pomuze-exportu-veri-pivovary>>.
- [3] *KamNaPivo.sk* [online]. 2009-07-04 [cit. 2010-03-15]. Špecifikum českého piva. Dostupné z WWW: <<http://www.kamnapivo.sk/webtron/specifikum-ceskeho-piva.html>>.
- [4] *České pivo* [online]. 2010 [cit. 2010-04-09]. České pivo. Dostupné z WWW: <www.ceskepivo.cz/index.php/Hlavni_strana>.
- [5] *České noviny* [online]. 2009-29-09 [cit. 2010-03-23]. Pivovar Černá hora získá ochrannou značku Evropské unie. Dostupné z WWW: <http://www.ceskenoviny.cz/zpravy/pivovar-cerna-hora-ziska-ochrannou-znacku-evropske-unie/400016&id_seznam=12>.
- [6] ZOUFALÝ, Tomáš; BRYNYCH, Petr. České pivo - každodenní fenomén. *Chemické Listy*. 2006-08, 100, s. 730.
- [7] BASAŘOVÁ, Gabriela; HLAVÁČEK, Ivo. *České pivo*. Praha : NUGA, 1998. 193 s. ISBN 80-85903-08-3
- [8] SUSA, Zdeněk. *Velká česká pivní kniha*. Středokluky : SUSA, 2008. 236 s. ISBN 978-80-86057-43-9.
- [9] *Budweiser Budvar* [online]. 2010 [cit. 2010-04-02]. Historie. Dostupné z WWW: <<http://www.budvar.cz/#/historie>>.
- [10] *Radegast Birell* [online]. 2009 [cit. 2010-04-25]. Historie. Dostupné z WWW: <<http://www.birell.cz/birell/historie/>>.
- [11] JURINA, Vladimír. *Plzeňský Prazdroj* [online]. 2009 - 04-01 [cit. 2010-04-19]. Spotřeba nealkoholického piva rekordně vzrůstá. Dostupné z WWW: <<http://www.prazdroj.cz/cz/pro-media/aktualne/648>>
- [12] PRUGAR, Jaroslav, et al. *Kvalita rostlinných produktů : na prahu 3. tisíciletí*. Praha: Výzkumný ústav pivovarnický a sladařský, 2008. 327 s. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [13] KOSAŘ, Karel, et al. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarnický a sladařský, 2000. 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
- [14] ZIMOLKA, Josef, et al. *Ječmen : formy a užitkové směry v České republice*. Praha : Profi Press, 2006. 200 s. ISBN 80-86726-18-5.

- [15] ZÁVORKA, Václav; ZIMA, František. *Chmelařství*. Praha : SZN, 1956. 279 s.
- [16] BENDOVIÁ, Olga; KAHLER, Miroslav. *Pivovarské kvasinky*. Praha : SNTL, 1981. 272 s.
- [17] PELIKÁN, M., SÁKOVÁ, L.: *Jakost a zpracování rostlinných produktů*. Jihočeská univerzita, České Budějovice, 2001, 235s. ISBN 80-7040-502-3.
- [18] DYR, Jiří. *Chemie a technologie sladu a piva : Díl 1.*. Praha : VŠCHT, 1965. 236 s. ISBN 05-225-62.
- [19] BASAŘOVÁ, Gabriela. Jak se vyrábí nízkoalkoholické a nealkoholické pivo. *Vesmír* [online]. 2005-04, 84, [cit. 2010-04-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.vesmir.cz/clanek/jak-se-vyrabi-nizkoalkoholicke-a-nealkoholicke-pivo>>. ISSN 1214-4029.
- [20] SELECKÝ, Radoslav; ŠMOGROVIČOVÁ, Daniela. Technologické a mikrobiologické aspekty výroby piva so sníženým obsahem alkoholu. *Chemické Listy*. 2007, 101, s. 542-549
- [21] SELECKÝ, Radoslav; ŠMORGOVIČOVÁ, Daniela; ŠULÁK, Matrin. Produkcia nízkoalkoholického piva mutantnými pivovarskými kvasinkami. *Kvasný průmysl*. 2005, 7-8, s. 235-239.
- [22] LACHMAN, Jaromír; ŠULC, Miroslav; SCHILLA, Marek. Comparison of the total antioxidant status of Bohemian wines during the wine-making process. *Food chemistry* [online]. 2007, 103, [cit. 2010-04-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-4M7KB39-3>>.
- [23] HOFTA, Pavel; DOSTÁLEK, Pavel; BASAŘOVÁ, Gabriela. Xanthohumol – chmelová pryskyřice nebo polyfenol?. *Chemické listy*. 2004, 98, s. 825 - 830.
- [24] SLATINA, Jiří; TÁBORSKÁ, Eva. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. 2004, 98, s. 239 - 245.
- [25] KARABÍN, Marcel, et al. Využití chemicky modifikovaných hořkých látek v pivovarnictví. *Chemické listy*. 2009_09, 103, s. 721 - 728.
- [26] LUBOMÍR, Opletal, et al. Přírodní látky hořké chuti. *Chemické listy*. 2007, 101, s. 895 - 906.
- [27] ČÍŽKOVÁ, Hana, et al. Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability piva. *Chemické listy*. 2006_07, 100, s. 478 - 485.
- [28] DIENSTBIER, Miroslav, et al. Metody předpovědi koloidní stability piva. *Chemické listy*. 2010_02, 104, s. 86 - 92.
- [29] KELLNER, Vladimír Pivo, vitamíny a další důležité látky pro výživu a zdraví člověka. In *Pivo, vitamíny a další důležité látky pro výživu a zdraví člověka*. Praha : Pivovarský

- ústav, 2003 [cit. 2010-04-03]. Dostupné z WWW:
<<http://www.beers.cz/index.php?detail=10086&sekce=2>>.
- [30] ZÍTKA, Ondřej, et al. Použití automatizované elektroforézy na čipu pro studium laktoferinu a matrixových metaloproteinů. *Chemické Listy*. 2010-03, 104, s. 197-201.
- [31] *University of Southern California* [online]. 1998 [cit. 2010-04-10]. Dostupné z WWW:
<<http://www.usc.edu/schools/pharmacy/private/images/BioRadExperion.jpg>>.
- [32] VANČURA, Miroslav ; BEDNÁŘ, Josef. *Pivovarsko-sladařská analytika*. Praha : SNTL, 1966. 312 s. ISBN 64-82366.
- [33] *Bio-Rad* [online]. 2008 [cit. 2010-04-10]. Dostupné z WWW: <http://www3.bio-rad.com/cmc_upload/Products/-33268/04-0652_experion_analysis_kits.jpg>.
- [34] TRČKOVÁ, Marie. *Využití metody LC/MS k analýze vybraných přírodních fyziologicky aktivních látek*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 100 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Radka Kočí, Ph.D.
- [35] Dvořáková, M., Hulín, P., Karabín, M., Dostálek, P.: Determination of Polyphenols in Beer by an Effective Method Based on Solid-Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *Czech Journal of Food Sciences*, 2007, roč. 25., č. 4, s. 182 – 188. ISSN 1212-1800
- [36] Thermo Finnigan: *Getting started*. USA: Technical publications, 2003.
- [37] PAŘILOVÁ, Kateřina: *Studium vybraných aktivních látek v českém pivu*. Brno, 2009. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

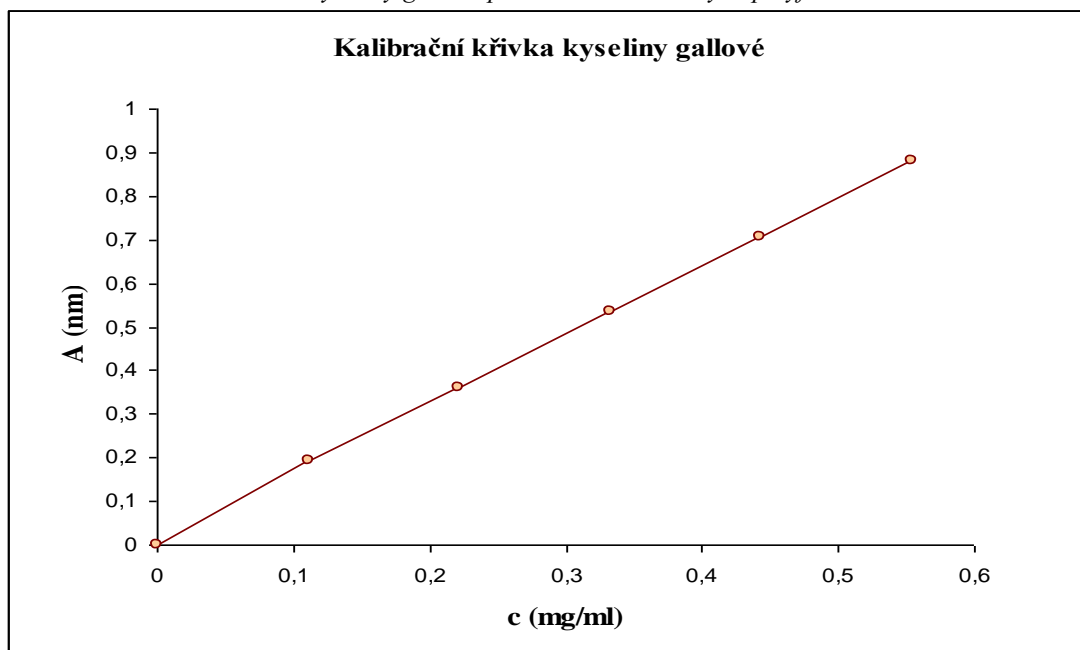
ABTS	2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6- sulfonát)
ACN	acetonitril
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LTP	lipid transfer protein
MS	hmotnostní spektrometrie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelné světlo

9 SEZNAM PŘÍLOH

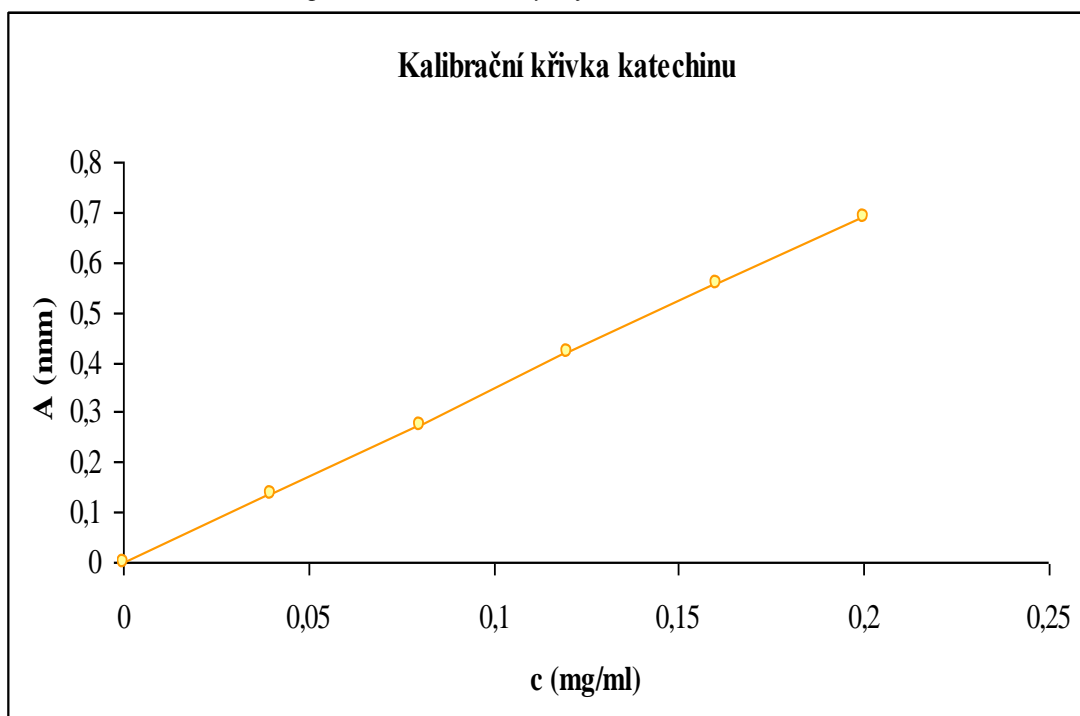
- 1) Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů
- 2) Kalibrační křivka katechinu pro stanovení celkových flavonoidů
- 3) MS spektra LC/MS analýzy polyfenolů u vybraných nealkoholických piv

10 PŘÍLOHY

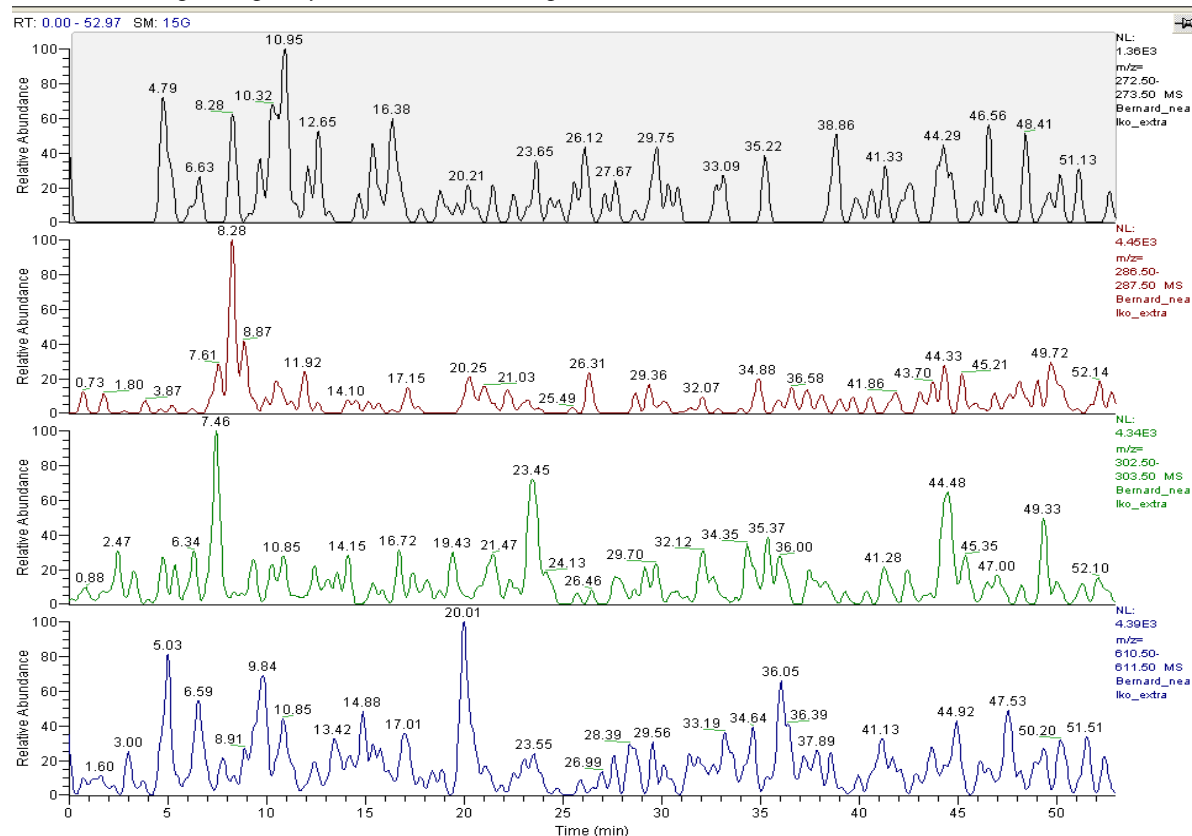
Příloha 1: Kalibrační křivka kyseliny gallové pro stanovení celkových polyfenolů



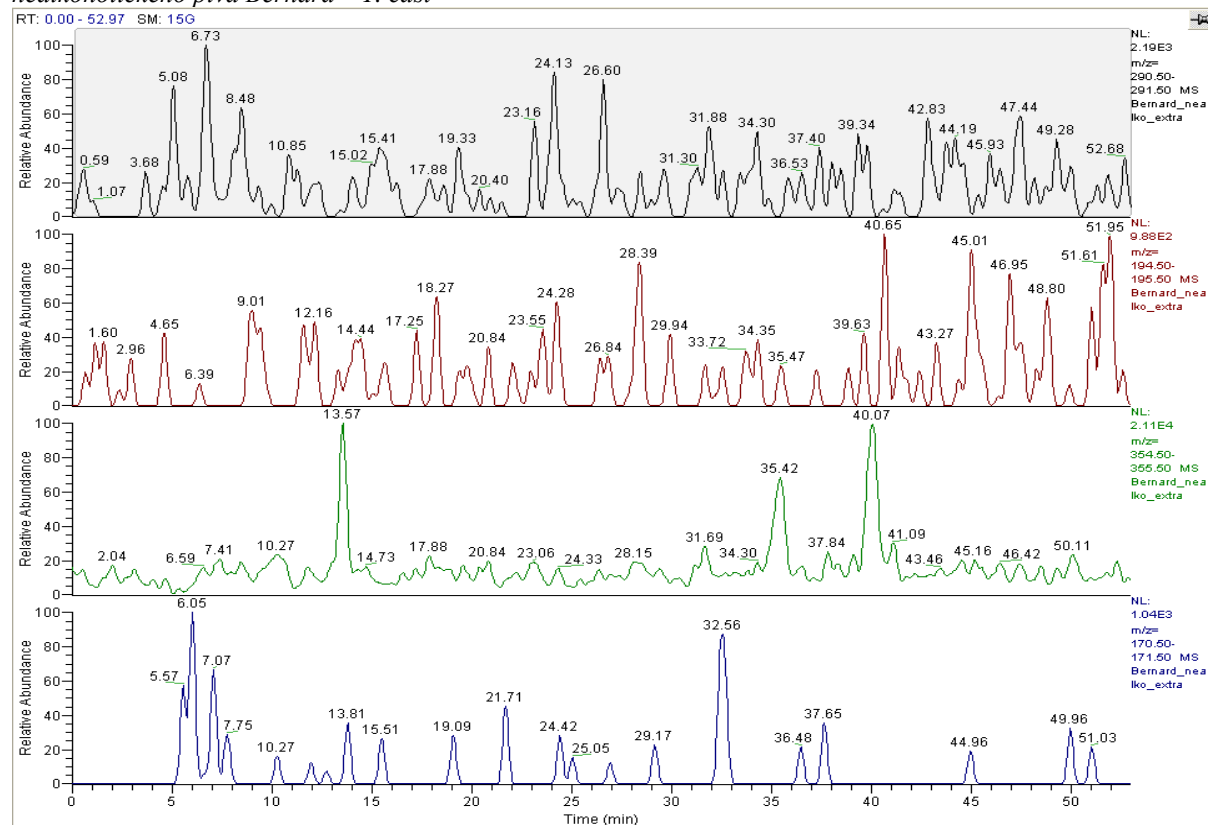
Příloha 2: Kalibrační křivka pro stanovení celkových flavonoidů



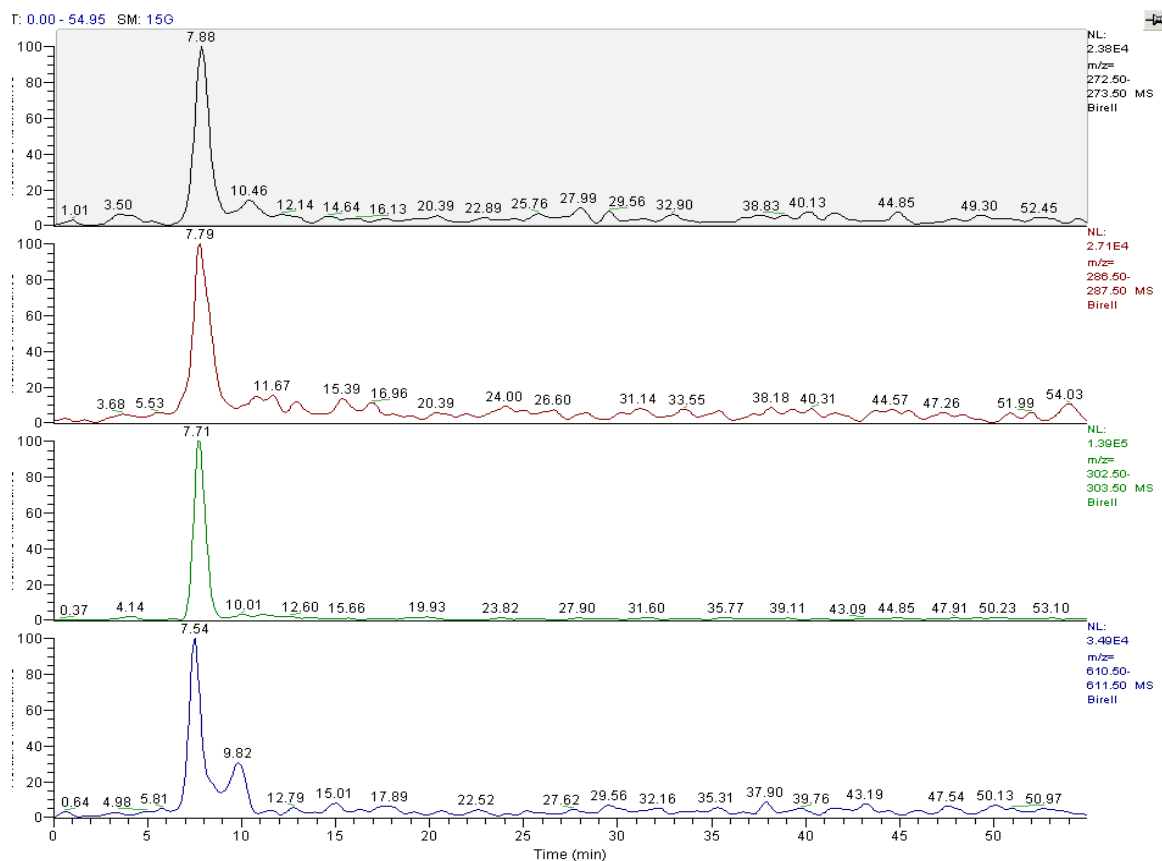
Příloha 3: MS spektra pro vybraná nealkoholická piva



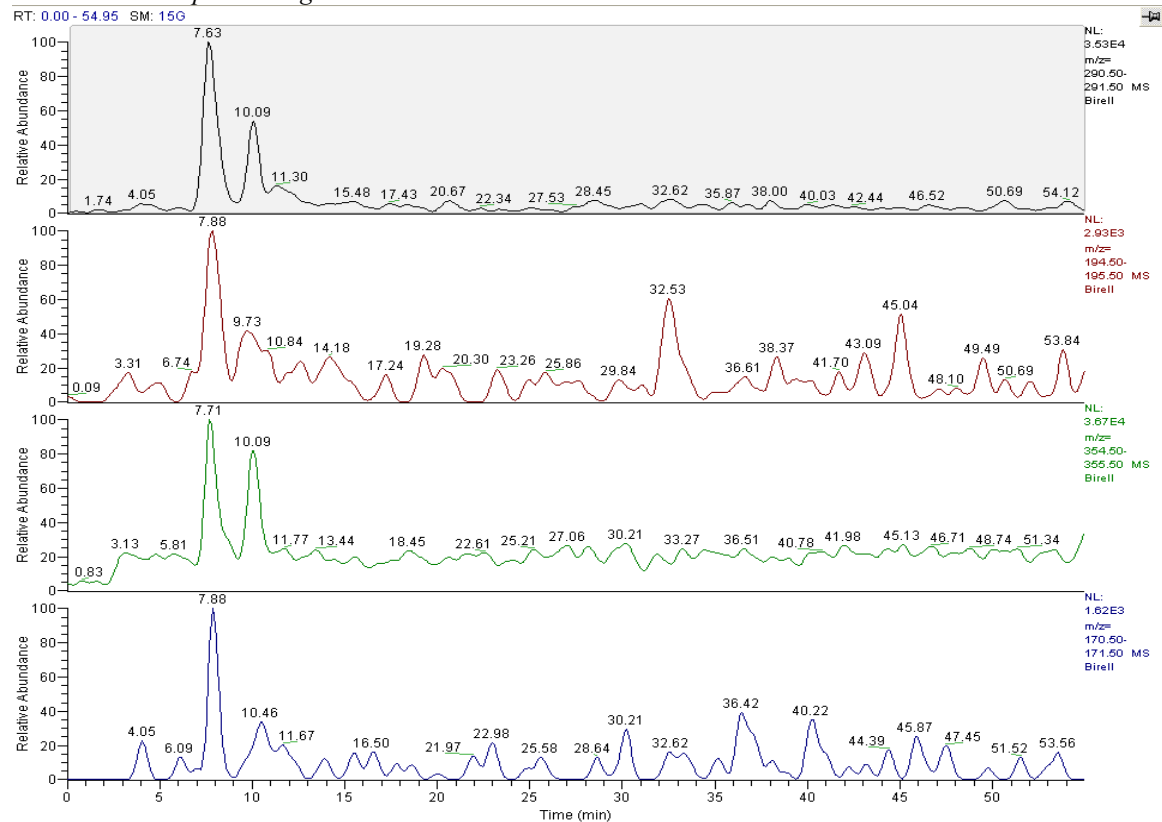
Obrázek 15: MS spektra pro vybrané m/z (272 naringenin; 286 luteolin; 302 morin; 610 rutin) u nealkoholického piva Bernard – 1. část



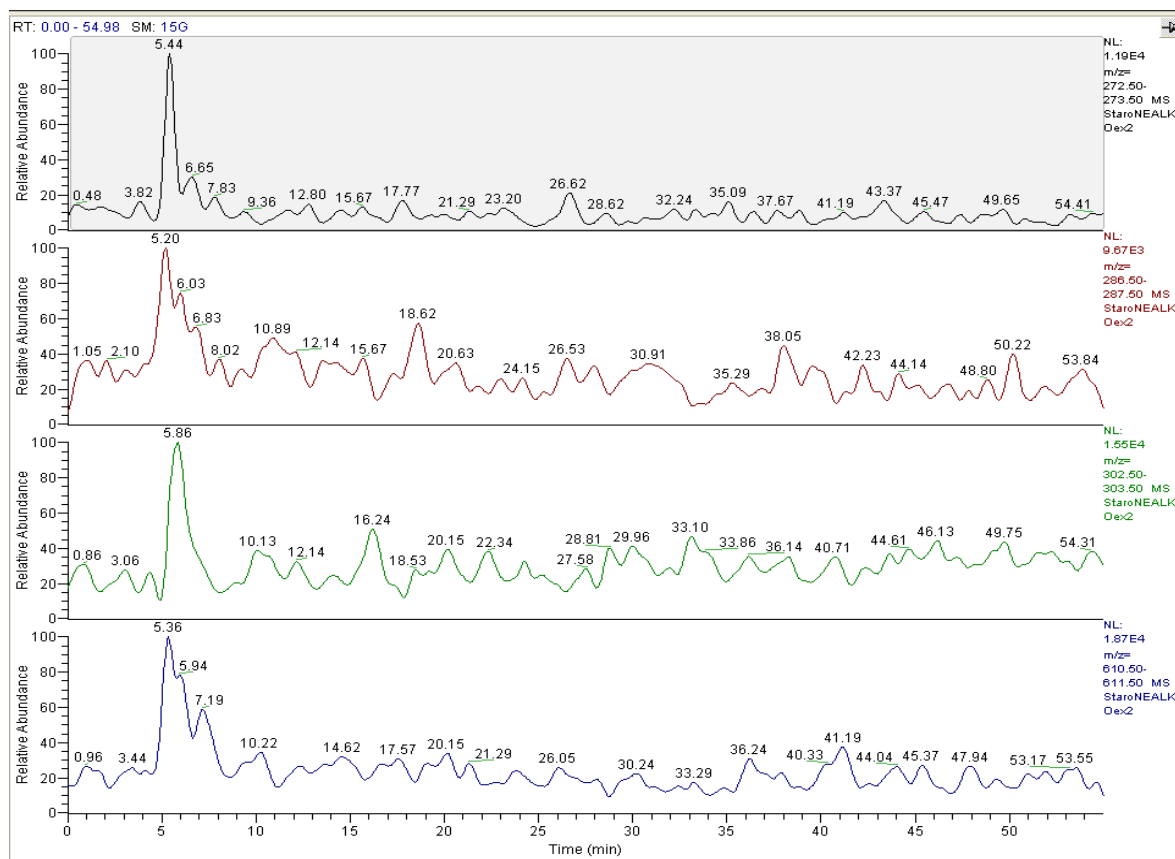
Obrázek 16: MS spektra pro vybrané m/z (290 katechin, epikatechin; 194 ferulová kyselina; 354 chlorogenová kyselina; 171 gallová kyselina) u nealkoholického piva Bernard – 2. část



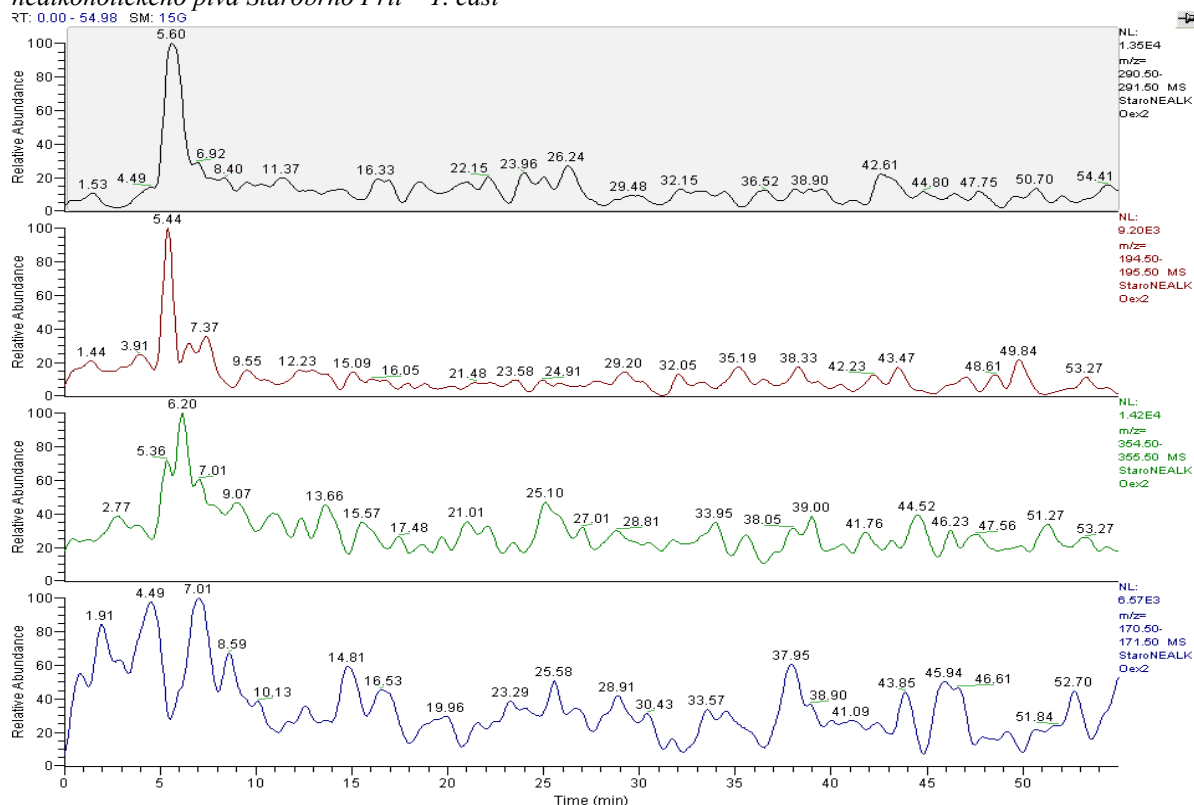
Obrázek 17: MS spektra pro vybrané m/z (272 naringenin; 286 luteolin; 302 morin; 610 rutin) u nealkoholického piva Radegast Birell – 1. část



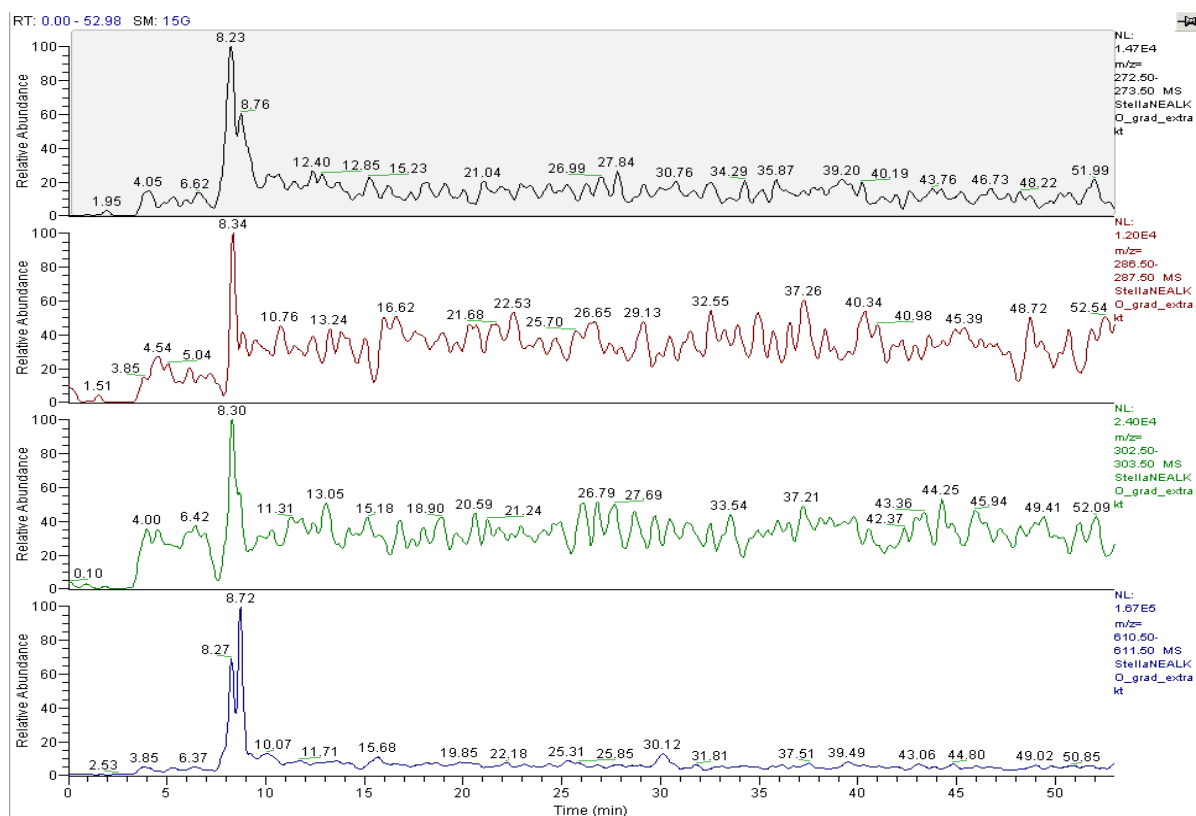
Obrázek 18: MS spektra pro vybrané m/z (290 katechin, epikatechin; 194 ferulová kyselina; 354 chlorogenová kyselina; 171 gallová kyselina) u nealkoholického piva Radegast Birell – 2. část



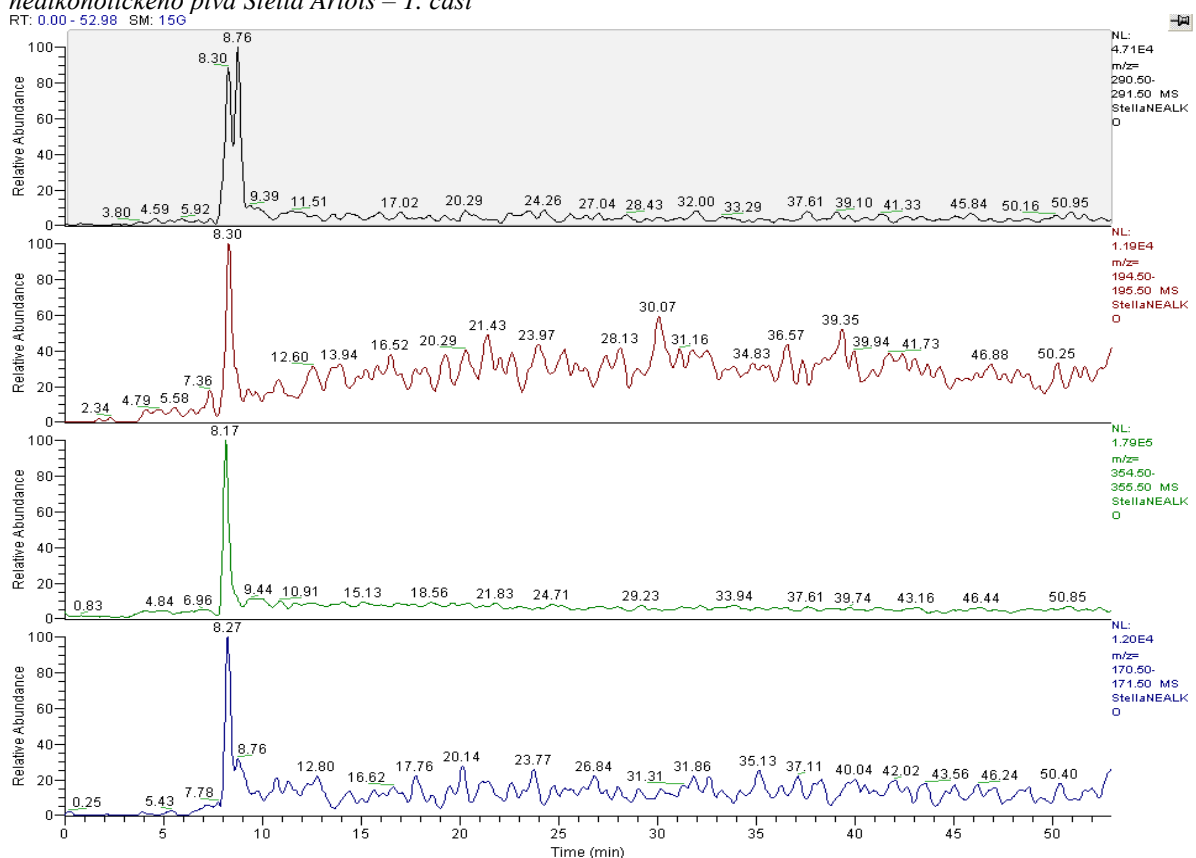
Obrázek 19 MS: spektra pro vybrané m/z (272 naringenin; 286 luteolin; 302 morin; 610 rutin) u nealkoholického piva Starobrno Fríi – 1. část



Obrázek 20: MS spektra pro vybrané m/z (290 katechin, epikatechin; 194 ferulová kyselina; 354 chlorogenová kyselina; 171 gallová kyselina) u nealkoholického piva Starobrno Fríi – 2. část



Obrázek 21: MS spektra pro vybrané m/z (272 naringenin; 286 luteolin; 302 morin; 610 rutin) u nealkoholického piva Stella Artois – 1. část



Obrázek 22: MS spektra pro vybrané m/z (290 katechin, epikatechin; 194 ferulová kyselina; 354 chlorogenová kyselina; 171 gallová kyselina) u nealkoholického piva Stella Artois – 2. část